

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS DOCTORAL

**Metabolismo de fosfolípidos durante el desarrollo fetal de
conejos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Roberto Arche Rey

DIRECTOR:

Ángel Martín Municio

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

X-53-053627-6

**METABOLISMO DE FOSFOLIPIDOS
DURANTE EL DESARROLLO FETAL DE CONEJOS**

BIBLIOTECA UCM



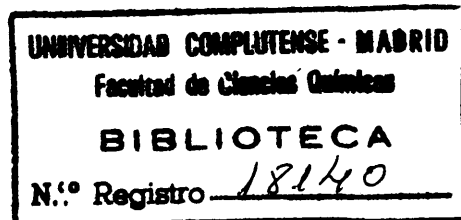
5302072955

MEMORIA

que para optar al Grado de Doctor en Ciencias Químicas

presenta

ROBERTO ARCHE REY



Madrid, 1975

El presente trabajo se ha llevado a cabo en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección del Profesor D. Angel - Martin Municio, a quien va dirigido mi agradecimiento por su valiosa ayuda.

Asímismo, deseo expresar mi reconocimien- to a los doctores Acebal y Castro, por su ines- timable colaboración en la realización del tra- bajo experimental.

INDICE

1. PARTE TEORICA

	<u>Página</u>
1.1 INTRODUCCION	11
1.2 ESPECIES MOLECULARES DE GLICEROLIPIDOS	14
1.2.1 Distribución posicional de ácidos grasos en glicerolípidos	14
1.2.2 Influencia de factores externos en la com posición y distribución de ácidos grasos en lípidos	17
1.3 BIOSINTESIS DE GLICEROLIPIDOS	18
1.3.1 Biosíntesis "de novo"	18
1.3.2 Mecanismo de desacilación--reacilación	21
1.3.3 Mecanismo de metilación	22
1.3.4 Mecanismo de intercambio de bases	23
1.4 RELACIONES ENTRE TRIGLICERIDOS Y FOSFOLIPIDOS EN EL METABOLISMO DE GLICEROLIPIDOS	24
1.5 BIOSINTESIS DE FOSFOLIPIDOS HEPATICOS	30
1.5.1 Biosíntesis en adultos	31
1.5.2 Biosíntesis en fetos	35
1.6 BIOSINTESIS DE FOSFOLIPIDOS PULMONARES	37
1.6.1 Biosíntesis en adultos	42
1.6.2 Biosíntesis en fetos	48

	<u>Página</u>
1.7 ACCIONES DE LA INSULINA SOBRE EL METABOLISMO LIPIDICO	53
1.7.1 Efecto sobre los niveles de lípidos plasmáticos	53
1.7.2 Efecto sobre la síntesis hepática de ácidos grasos	53
1.7.3 Efecto sobre la síntesis de triglicé ridos de hígado y plasma	55
1.8 INFLUENCIA DE LA GESTACION SOBRE EL METABOLISMO DE LIPIDOS	56
1.8.1 Modificación cuantitativa de los lípi dos plasmáticos	56
1.8.2 Influencias hormonales	59
1.8.3 Biosíntesis de lípidos	63
1.9 ESTUDIOS SOBRE LAS RELACIONES HORMONALES ENTRE MADRE Y FETO	66

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 MATERIAL BIOLOGICO	71
2.2 ADMINISTRACION DE INSULINA	71
2.3 EXTRACCION DE LIPIDOS TOTALES DE TEJIDOS	72
2.3.1 Separación cromatográfica de los lípidos totales de tejidos	73
2.4 ANALISIS DE ACIDOS GRASOS TOTALES DE TRIGLICE- RIDOS Y FOSFOLIPIDOS DE TEJIDOS, OBTENCION DE ESTERES METILICOS Y ANALISIS POR GLC	74
2.5 HIDROLISIS ENZIMATICA DE FOSFOLIPIDOS PARA ES- TUDIAR LA DISTRIBUCION POSICIONAL DE ACIDOS GRASOS	76
2.6 HIDROLOSIS DE TRIGLICERIDOS CON LIPASA PANCREA TICA PARA ESTUDIAR LA DISTRIBUCION PARCIAL DE ACIDOS GRASOS	79

	<u>Página</u>
2.7 BIOSINTESIS DE FOSFOLIPIDOS A PARTIR DE PRE- CURSORES RADIOACTIVOS	79
2.7.1 Preparación de homogeneizados	80
2.7.2 Aislamiento de fracción microsomal	80
2.7.3 Preparación del medio de incubación	81
2.7.4 Incubación y cromatografía para sepa- rar fosfolípidos	82
2.7.5 Medidas de radioactividad por centelleo líquido	84
2.8 VALORACION DE PROTEINAS	86

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 ANALISIS CUANTITATIVO DE ACIDOS GRASOS DE LI- PIDOS TOTALES, FOSFOLIPIDOS Y TRIGLICERIDOS EN HIGADO MATERNO Y FETAL DE CONEJO. VARIACIO- NES INDUCIDAS POR LA GESTACION Y LA ADMINIS- TRACION PROLONGADA DE INSULINA	91
3.2 DISTRIBUCION POSICIONAL DE ACIDOS GRASOS EN FOSFATIDILCOLINA DE HIGADO Y PULMON MATERNO Y FETAL DE CONEJOS. VARIACIONES INDUCIDAS POR LA GESTACION Y LA ADMINISTRACION PROLONGADA DE INSULINA	100
3.3 DISTRIBUCION POSICIONAL DE ACIDOS GRASOS EN FOSFATIDILETANOLAMINA DE HIGADO Y PULMON MA- TERNO Y FETAL. VARIACIONES INDUCIDAS POR LA GESTACION Y LA ADMINISTRACION PROLONGADA DE INSULINA	107
3.4 DISTRIBUCION PARCIAL DE ACIDOS GRASOS EN TRI- GLICERIDOS DE HIGADO Y PULMON MATERNO Y FETAL. VARIACIONES INDUCIDAS POR LA GESTACION Y LA AD- MINISTRACION PROLONGADA DE INSULINA	113
3.5 EXPERIENCIAS DE INCORPORACION DE PRECURSORES RADIOACTIVOS EN DISTINTAS CLASES DE FOSFOLIPI- DOS	120

	<u>Página</u>
4. RESUMEN Y CONCLUSIONES	143
5. BIBLIOGRAFIA	151

1. PARTE TEORICA

1.1 INTRODUCCION

Los lípidos son unas biomoléculas que se definen como las que se obtienen de las células de los organismos vivos por extracción con solventes orgánicos, pero esta definición es enormemente genérica - comprende un elevado número de clases diferentes, que a su vez se pueden separar en distintas especies moleculares, según la naturaleza y distribución de sus ácidos grasos constituyentes. Según va avanzando la investigación en su estructura y función se va comprendiendo mejor el gran número de papeles diferentes que desempeñan en el organismo, entre los cuales podemos señalar como fundamentales el ser los principales depósitos energéticos intracelulares, ser una forma de transporte del combustible metabólico y constituir una fracción esencial en las membranas celulares. Asimismo, entre estas sustancias se encuentran algunas que poseen papeles fundamentales en el metabolismo y su regulación, como pueden ser algunas vitaminas, o sus precursores, y un gran número de hormonas.

El estudio de este grupo complejo de moléculas no hubiera sido posible si no se hubiesen desarrollado poderosas técnicas de separación y análisis entre las cuales la más versátil ha sido la cromatografía, en sus distintas variedades, la cual ha permitido un enorme avance en los últimos años del conocimiento del significado biológico de estas sustancias.

El metabolismo de lípidos en animales superiores es bien conocido, al menos en su aspecto más general, en estados metabólicos normales, habiendo adquirido en los últimos años gran importancia el estudio de las variaciones que suponen en dicho metabolismo los estados no normales, como, por ejemplo, distintos estados patológicos o estados como la gestación y el desarrollo fetal.

Actualmente se sabe con certeza que un elevado número de enfermedades provocan alteraciones en el metabolismo lipídico, o son causadas por deficiencias de este metabolismo, pudiendo citar como ejemplos más clásicos la diabetes y las alteraciones cardiovasculares concomitantes con alteraciones metabólicas de distintas clases de lípidos.

Asimismo, se sabe que la gestación induce cambios esenciales en todos los niveles del metabolismo intermediario y resulta evidente que el conocimiento de estas variaciones metabólicas tiene gran importancia, no sólo científica, sino práctica, pues el metabolismo intermediario es el índice más preciso de la condición metabólica de un organismo. Se comprende que cuando se conozcan perfectamente estas variaciones se podrá atribuir a este estado su verdadera significación fisiológica y se encontrará la solución, a nivel clínico, de muchos estados patológicos asociados a la gestación.

Por otro lado, la evolución fetal lleva anejada muchos de los problemas más interesantes de la bioquímica del desarrollo. El feto es un ser dependiente en la totalidad de sus suministros de la madre, dependencia que tiene lugar a través de un órgano materno, la placenta, de una complejidad metabólica extraordinaria y cuyo metabolismo se ha comenzado a estudiar intensamente en los últimos años. Es evidente entonces que el metabolismo fetal depende en última instancia del metabolismo materno y que las alteraciones de este último se traducirán en alteraciones del metabolismo fetal, alteraciones que pueden llegar a impedir totalmente el desarrollo del feto.

El feto sufre unos cambios drásticos en su metabolismo durante el proceso de desarrollo y un metabolismo sencillo en sus inicios pasa a un metabolismo casi tan complejo como el de un animal adulto en las últimas etapas de la gestación cuando los diferentes órganos van madurando y adquiriendo su funcionalidad característica.

Dentro de esta maduración de los órganos fetales ha adquirido enorme importancia en los últimos años el estudio del desarrollo de la actividad pulmonar, esencial para mantener vivo el organismo después del nacimiento. Si tenemos en cuenta que la causa más frecuente de la mortalidad en nacimientos prematuros es una falta de madurez pulmonar que se traduce en cuadros clínicos muy típicos (atelectasis pulmonar, cianosis, edemas alveolares, etc.) resulta evidente la importancia del conocimiento del metabolismo pulmonar y del proceso de maduración del órgano, sobre todo en la última fase de la gestación y en los momentos anteriores al nacimiento.

Actualmente parece bien establecido que el proceso de maduración pulmonar incluye la biosíntesis y secreción al fluido alveolar de determinados fosfolípidos cuya misión es disminuir la tensión superficial de la interfase airefluido alveolar una vez comenzada la respiración, evitando el colapsamiento de los alveolos. Entre estos fosfolípidos el principal responsable de esta actividad superficial es una lecitina, concretamente la dipalmitoil-3-sn-fosfatidilcolina, que aparece en grandes cantidades en el pulmón fetal en la última etapa del desarrollo y principalmente en los momentos anteriores y posteriores al nacimiento. En los estados anteriormente mencionados de inmadurez fetal se ha demostrado que existe una ausencia o baja concentración de esta lecitina en el fluido alveolar, lo que impide el funcionamiento normal del pulmón.

El conocimiento de los mecanismos de biosíntesis y secreción de estos surfactantes pulmonares ayudará a esclarecer estos aspectos patológicos de la funcionalidad del pulmón y quizá permita algún día aumentar la viabilidad de fetos prematuros, uno de los problemas más graves con que se encuentra hoy día enfrentada la medicina perinatal.

1.2 ESPECIES MOLECULARES DE GLICEROLIPIDOS

1.2.1 DISTRIBUCION POSICIONAL DE ACIDOS GRASOS EN GLICEROLIPIDOS

Previo a los estudios de metabolismo de lípidos en general y - de glicerolípidos en particular, se hace necesario disponer de una metodología experimental que permita conocer la composición de ácidos - grasos de un determinado lípido, pues esta composición es muy variada / origina un gran número de especies moleculares diferentes. Si tene- nos en cuenta que en un triglicérido hay ácidos grasos esterificando - los tres grupos hidroxilo del glicerol y en un fosfolípido los de las posiciones 1 y 2 (*), es fácil ver que el número de especies diferen- tes será muy elevado y el análisis de la distribución y la composición de ácidos grasos en cada posición no es una tarea rutinaria y puede - llegar a ser muy complicada en algunos casos.

Para esta tarea ha sido de gran ayuda la utilización de técni- cas combinadas de hidrólisis enzimática y química y la utilización de cromatografía de capa fina y de gas-líquido como medios de separación.

En el caso de glicero fosfolípidos el análisis de la distribu- ción de ácidos grasos entre las posiciones 1 y 2 se puede hacer utili- zando una enzima hidrolítica que separa específicamente el ácido graso de la posición 2. Esta enzima es la fosfolipasa A₂ (Fosfátido-acil hi- drolasa. E.C. 3.1.1.4), que al hidrolizar la posición 2 origina una - mezcla del lisoderivado correspondiente y ácidos grasos libres.

(*) El sistema de numeración que utilizaremos es el propuesto por - Hirschamann y recomendado por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica de la IUB. Eur. J. Biochem., 2, 127, (1967).

La separación de esta mezcla se logra mediante cromatografía - en capa fina de silica gel (Mangold, 1961) y el análisis cuantitativo de los ácidos grasos libres y del lisoderivado se lleva a cabo, previa transformación en los correspondientes ésteres metílicos (Metcalf, 1961), por cromatografía gas-líquido. Con estos datos puede reconstruirse la composición del fosfolípido, la cual debe coincidir con la obtenida de la metanolisis del fosfolípido total.

Utilizando este método general se ha podido estudiar la composición y la distribución de un gran número de fosfolípidos procedentes de muy diversas fuentes biológicas (Haverkate y van Deenen, 1966; Okuyama et al., 1967; Van Golde, 1968; Fernández-Sousa et al., 1971a y 1971b), y de los datos conocidos se puede generalizar que en la posición 1 predominan los ácidos grasos saturados, mientras que en la posición 2 predominan los insaturados, aunque se han encontrado variaciones cuantitativas en algunos casos (Fernández-Sousa et al., 1971b)

Es conveniente señalar que esta enzima puede presentar diferencias de especificidad de sustrato según su origen. Por ejemplo, la enzima aislada de veneno de serpiente hidroliza preferentemente lecitinas, mientras que la de páncreas muestra más especificidad por los fosfolípidos ácidos (ácido fosfatídico, cardiolipinas). En nuestro caso encontramos que la fosfolipasa de *Crótalus adamanteus* empleada en principio, no hidrolizaba la fosfatidiletanolamina de pulmón y fue necesario emplear venenos de otras fuentes (*Naja naja* y *Naja haje*) para conseguir la hidrólisis total.

Para el análisis de los triglicéridos debemos de tener en cuenta como premisa previa que el procedimiento enzimático hace uso de la lipasa pancreática (EC 3.1.1.3) que es una glicérido hidrolaza específica de la posición α del glicerol, pero que no distingue la posición 1 de la 3, separándonos la mezcla de ácidos grasos de las dos posiciones (Coleman y Fulton, 1961). La distribución que vamos a obte-

ner será por lo tanto parcial obteniendo la composición de las posiciones 1 + 3 y 2. Varios autores (Brockerhoff, 1972) han desarrollado combinaciones de métodos enzimáticos y químicos que permiten el análisis estereoquímico completo de la molécula, un proceso complejo y no siempre fácil experimentalmente, cuya exposición sale fuera del objeto de este trabajo. Nosotros hemos obtenido distribuciones parciales, que son suficientes para muchos objetivos.

El método es similar al empleado en fosfolípidos. Se hidrolizan los triglicéridos con lipasa pancreática y la mezcla de ácidos grasos (1+3) y monoglicéridos (2) se separa en capa fina. Las fracciones se metanolizan y analizan por cromatografía gas-líquido, obteniendo una composición que permite reconstruir la de los triglicéridos originales.

En la distribución de ácidos grasos en triglicéridos se ha encontrado también una cierta regularidad parecida a la de los fosfolípidos, con unas posiciones α (1+3) ocupadas preferentemente por ácidos saturados y la β (2) por insaturados, aunque el número de excepciones es mayor que en los fosfolípidos. En general, en tejidos animales, con la única excepción de cerdo y humano, los análisis demuestran que la posición 1 es ocupada preferentemente por ácidos saturados, la 2 por ácidos insaturados de cadena corta y la 3 por ácidos de cadena larga, tanto saturados como insaturados, pero con predominio de los primeros (Brockerhoff, 1972). En cerdo y humano, así como en leche de cetáceos y bovino se ha encontrado un predominio de ácido palmítico en posición 2. La distribución encontrada por nosotros en conejo sigue la norma general de predominio de cadenas saturadas en posición α e insaturadas en posición β .

1.2.2 INFLUENCIA DE FACTORES EXTERNOS EN LA COMPOSICION Y DISTRIBUCION DE ACIDOS GRASOS EN LIPIDOS.

La composicion de ácidos grasos de lípidos de plasma y los distintos tejidos puede ser alterada por distintos factores exógenos, entre los que se pueden citar como más importantes la dieta y las influencias hormonales, así como la administración de distintas sustancias.

La dieta, y sobre todo una dieta rica en grasas, ejerce una gran influencia en la composición de ácidos grasos de los lípidos de la sangre y los tejidos, aunque el efecto cuantitativo es diferente según las especies (O'Hea y Leveille, 1969; Abraham, 1970; Holman, 1963; Dryden et al., 1973). Por otra parte, la alimentación durante un período prolongado con una dieta de bajo contenido de proteínas puede alterar la composición de ácidos grasos de fosfolípidos de hígado de rata (Rogers, 1972). Estos cambios incluyen una disminución de las proporciones de los ácidos esteárico, araquidónico y docosahexaenoico y un aumento de oleico y linoleico. También se altera la morfología y composición de ácidos grasos de mitocondrias de hígado de rata (Harada 1967; Rogers, 1971), siendo las diferencias observadas una elevación de los ácidos palmítico, oleico y docosapentaenoico y una disminución de esteárico y araquidónico. Noble et al., (1971a) han estudiado los cambios en la composición de lípidos del tejido adiposo perirrenal en corderos alimentados con una leche materna o con una leche sintética de bajo contenido en grasas durante los primeros ocho días desde el nacimiento. En el recién nacido el ácido graso más abundante en triglicéridos y fosfolípidos era el 18:1, mientras que los poliinsaturados estaban localizados exclusivamente en los fosfolípidos; en los animales alimentados con leche materna se observó un aumento considerable del 18:2 y un descenso del 20:3 durante los ocho días siguientes. En los alimentados con leche sintética no se vieron cambios en estos dos ácidos. Estos auto

res estudiaron también la distribución posicional de ácidos grasos en los lípidos del tejido adiposo perirrenal, observando que esta varía según el tipo de dieta recibida por el animal.

Jurand y Oliver (1970) han observado que la administración a humanos de hormona del crecimiento durante tres días provoca un aumento en los porcentajes de palmítico en triglicéridos y de linoleico y eicosatrienoico en fosfolípidos de suero, así como un descenso del porcentaje de oleico en fosfolípidos.

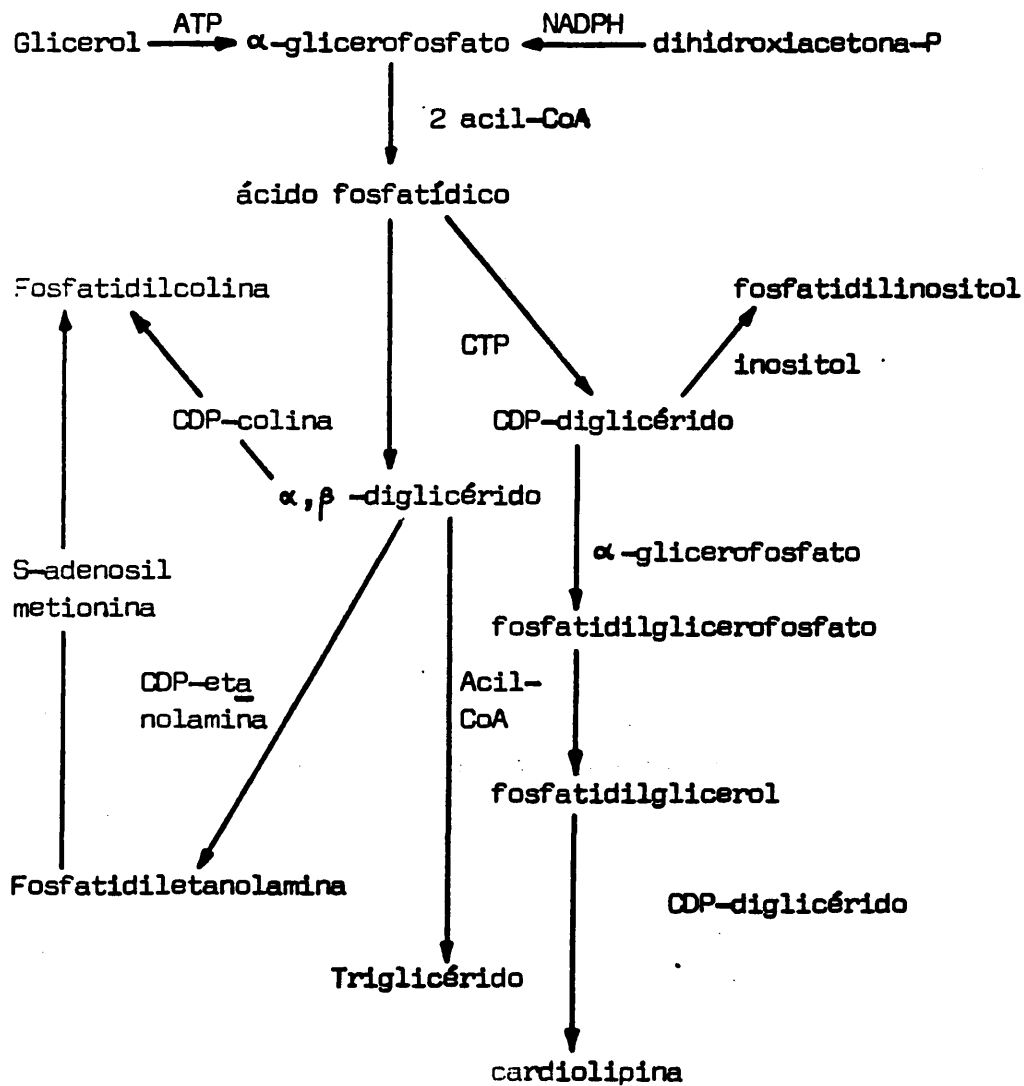
La administración de ciertas sustancias exógenas es capaz de provocar un cambio en los niveles normales de ácidos grasos y en su distribución en las distintas clases de lípidos. Así, el tratamiento con clofibrate de pacientes con hiperlipoproteinemía cambia la composición de ácidos grasos en fosfolípidos (incrementa el porcentaje de nervónico), en triglicéridos (aumenta el eicosapentaenoico) y en esteres de colesterol (se eleva el ácido linolénico) (Takayasu et al. 1971).

1.3 BIOSINTESIS DE GLICEROLIPIDOS

1.3.1 BIOSINTESIS "de novo"

La biosíntesis "de novo" de triglicéridos y fosfolípidos tiene lugar mediante una ruta que es en parte común para ambas clases de glicerolípidos y que tiene como intermediario central el ácido fosfatídico (Kennedy, 1961) (Fig. 1).

El mecanismo principal de la síntesis del glicerol lípídico es a través del α -glicerofosfato que procede de la fosforilación del glicerol por ATP, catalizada por una gliceroquinasa, o por reducción de dihidroxiacetona-fosfato catalizada por una reductasa dependiente



Esquema de biosíntesis de Triglicéridos y Fosfolípidos

(Kennedy, 1961)

Fig. 1

de NADP. Ambas son reacciones que ocurren en el citoplasma celular. Existe además otro mecanismo que implica la acilación previa de la dihidroxiacetona-fosfato y su posterior reducción con NADPH.

Existen diferencias entre los distintos tejidos respecto a la síntesis de α -glicerofosfato y así, por ejemplo, en tejido adiposo - la fosforilación de glicerina es un mecanismo cuya importancia cuantitativa es prácticamente nula, lo cual ha sido interpretado por Margolis y Vaughan (1962) como una falta en el tejido de la gliceroquinasa que, sin embargo, se muestra enormemente activa en hígado. Posteriormente otros autores (Robinson y Newholme, 1967) han señalado la existencia de actividad de gliceroquinasa, si bien muy baja, en tejido adiposo de rata, hecho que ha sido comprobado por otros autores (Kornchinsky et al., 1970).

Los estudios realizados "in vitro" por Rongstad y col. (1974) en células aisladas de hígado de rata demuestran que el mecanismo de acilación previa de la dihidroxiacetona-fosfato y posterior reducción no es cuantitativamente significativo, aunque queda por demostrar la importancia relativa "in vivo" de esta ruta y al de acilación del α -glicerofosfato.

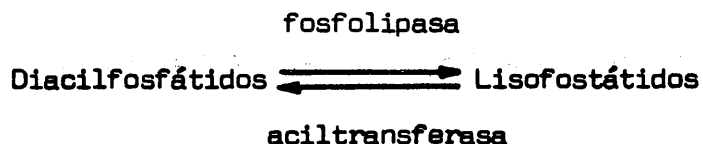
Respecto a la localización subcelular y la especificidad del sustrato en la acilación del α -glicerofosfato los estudios realizados ponen de manifiesto que en hígado las enzimas acilantes están localizadas en la membrana mitocondrial externa y en el retículo endoplasmático, y que los sustratos más efectivos son los ácidos grasos saturados en diversas especies de mamíferos (rata, conejo, bovino, mono, humano), para la fracción mitocondrial, mientras que en los microsomas tanto los saturados como los insaturados son buenos sustratos. Los productos son principalmente ácido lisofosfatídico en mitocondrias y fosfatídico en microsomas (Daae, 1972a, 1972b, 1973).

La síntesis "de novo" de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina a partir del ácido fosfatídico puede tener lugar por dos mecanismos diferentes, uno de los cuales parte del α, β -diglicérido y utiliza CDP-colina y CDP-etanolamina como sustratos para la fosfotransferasa, y otro a través del CDP-diglicérido y L-serina que origina en principio fosfatidilserina, la cual se descarboxila a fosfatidiletanolamina y posteriormente se metila para rendir finalmente la lecitina. Este segundo mecanismo es el que predomina en bacterias y los trabajos más recientes indican que no tiene lugar en animales superiores.

La reacción de la CDP-colina (etanolamina): 1,2-diacilglicerolcolina (etanolamina) fosfotransferasa ha sido estudiada por varios autores y se ha comprobado que la reacción es reversible en fracción microsomal de hígado de rata (Kano y Ohno, 1973; Sinclair, 1971; Sundler et al., 1974) y que los diglicéridos formados en la reacción inversa a partir de lecitinas endógenas son degradados por la fracción microsomal que posee a su vez una actividad de diglicéridofosfoquinasa que utiliza los diglicéridos exógenos y endógenos para originar ácidos fosfatídicos. Estos 1,2-diglicéridos formados a partir de las lecitinas endógenas en la fracción microsomal pueden ser reutilizados para la posterior síntesis de fosfatidilcolinas y triglicéridos (Kano y Ohno, 1973b).

1.3.2 MECANISMO DE DESACILACION-REACILACION

Como hemos visto anteriormente la distribución de ácidos grasos en fosfolípidos muestra un predominio de saturados en posición 1 y de insaturados en posición 2. Lands (1963) postuló que esta distribución asimétrica puede ser el resultado de una reacción de transacilación en la cual intervendrían dos enzimas, una fosfolipasa y una aciltransferasa.



Esta reacción fue encontrada por primera vez en 1962 por Erbland y Marinetti en sobrenadante de hígado de rata y posteriormente fue puesto de manifiesto también en sobrenadante de pulmón (Van den Bosch et al., 1965) y fracción microsomal de hígado de rata (Erbland y Marinetti, 1965) Los experimentos de estos autores han demostrado que la incorporación de lisolecitina a lecitina tiene lugar "in vitro" mediante acilación directa, y que la transacilación entre dos lisolecitinas sólo se manifiesta "in vitro" en condiciones de deficiencia energética en el citosol.

Sin embargo, se ha demostrado utilizando cortes de pulmón de rata incubados "in vitro" que la transacilación entre dos lisolecitinas es el mecanismo más importante en la biosíntesis de dipalmitoil-lecitina (Akino y col., 1971).

1.3.3 MECANISMO DE METILACION

La N-metilación de la fosfatidiletanolamina por transferencia de grupos metilo cedidos por la S-adenosilmetionina es un mecanismo de síntesis de lecitinas que está bien establecido experimentalmente (Gibson et al., 1961). Las experiencias iniciales de Gibson (1961) y Breemer y Greenberg (1961) sugerían que el único sustrato susceptible de sufrir la metilación era la molécula completa de fosfatidiletanolamina. Sin embargo, Salerno y Beeler (1973) han encontrado que en la síntesis "in vivo" de fosfolípidos y sus precursores, en hígado de rata, la reacción de metilación le dan no sólo la fosfatidiletanolamina sino también la etanolamina, fosforiletanolamina y CDP-etanolamina, por lo cual proponen una revisión del concepto general de que sólo la molécula completa puede metilarse. Al mismo tiempo - han demostrado que esta metilación produce fundamentalmente especies insaturadas de lecitina.

1.3.4 MECANISMO DE INTERCAMBIO DE BASES

Ultimamente, se han ido acumulando evidencias cada vez más concluyentes de que la colina se incorpora "in vivo" a lecitinas de hígado de rata por un mecanismo que no utiliza CDP-colina como precursor - (Treble et al., 1970; Bjerve, 1971, 1972). Este mecanismo "in vivo" debe ser idéntico al responsable de la incorporación de colina "in vitro" dependiente de Ca^{2+} (Dils y Hübscher, 1961), mecanismo que ha sido encontrado también en cerebro de pollo (Porcellati et al., 1971) y rata (Kaufer, 1972), habiendo comprobado que la máxima actividad corresponde a la fracción microsomal.

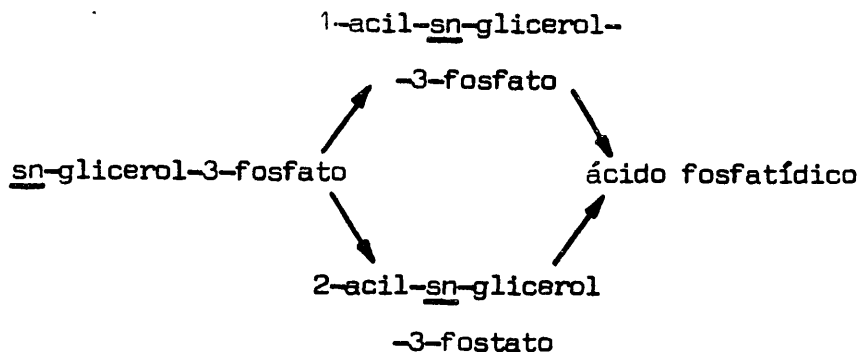
Este mecanismo de incorporación de bases libres debe ser el - sistema principal de síntesis "in vivo" de fosfatidilserina en hígado, mientras que en la formación "in vivo" de lecitinas y fosfatidiletanolaminas este intercambio de bases es cuantitativamente despreciable - (Bjerve, 1973a) frente a la síntesis vía CDP-base.

Bjerve (1973b) ha establecido que en microsomas de hígado de - rata pueden actuar como sustratos la fosfatidilserina, colina y etanolamina con la única restricción de que la etanolamina no puede convertirse en colina.

4. RELACIONES ENTRE TRIGLICERIDOS Y FOSFOLIPIDOS EN EL METABOLISMO DE GLICEROLIPIDOS

Como ya hemos tenido ocasión de señalar en apartados anteriores los glicerolípidos naturales se caracterizan por tener una distribución asimétrica de sus constituyentes acílicos. En general, y aunque existen excepciones, está bien establecido que la composición de los ácidos grasos en las posiciones 1 y 2 de los triacil-glicéridos y de los diacil-fosfátidos es similar, y esta similitud está en concordancia con la suposición de que ambos se sintetizan a partir de un precursor común que es el diacilglicerol (Kennedy, 1961). A su vez, esta especificidad de las posiciones 1 y 2 respecto a determinados ácidos grasos es, en la mayor parte de los casos, resultado de la especificidad en la acilación del α -glicerofosfato para dar el ácido fosfatídico, precursor directo del diacilglicerol. Numerosos autores han abordado el problema de como se desarrolla esta especificidad durante la síntesis y de las relaciones existentes entre las distintas clases de glicerolípidos.

Los primeros experimentos "in vitro" de Hill et al., (1968), Possmayer (1969), Sánchez de Jiménez y Cleland (1969), Husbands y Lands (1970) y otros, indicaban la existencia de dos aciltransferasas diferentes para las dos acilaciones del α -glicerofosfato. Habrá, pues, dos posibles rutas para la síntesis del ácido fosfatídico:



Los estudios de Okuyama et al., (1971) y Tamai (1972) demostraron que la síntesis de ácido fosfatídico en mamíferos transcurre casi exclusivamente a través de 1-acil-sn-glicerol-3-fosfato con sólo un 5% de - acilación en el carbono 2.

En estos experimentos "in vitro" se puso asimismo de manifiesto que la acilación, tanto del glicerol-3-fosfato como la del monoacilglicerol, tiene escasa especificidad y que ésta depende sobre todo de las condiciones de incubación, siendo la segunda aciltransferasa más susceptible de especificidad que la primera.

En fuerte contraste con estos estudios "in vitro" numerosos - autores han demostrado que en cortes de tejido o en animales enteros la distribución asimétrica de los ácidos tiene lugar preferentemente durante la síntesis del ácido fosfatídico (Hill. et al., 1968; Akesson et al., 1970a, 1970b). Los resultados de estas experiencias "in vivo" o "in vitro" con cortes de tejido sugieren que la introducción de los ácidos grasos en el glicerol-3-fosfato durante la síntesis "de novo" del ácido fosfatídico tiene lugar de una manera altamente específica: los ácidos grasos saturados esterifican preferentemente el carbono 1 y los insaturados el carbono 2, al mismo tiempo que las especies sintetizadas en mayor proporción son las mono- y dienoicas.

Recientemente, Yamashita et al. (1972a, 1972b) han conseguido purificar parcialmente las aciltransferasas, partiendo de homogeneizados de fracción microsomal de hígado de rata y han establecido que - hay dos fracciones principales, una que sedimenta en el fondo de un - gradiente de sacarosa con actividad de glicerofosfato aciltransferasa y otra que permanece en la fracción rica en membrana del principio - del gradiente y que muestra actividad de 1-acil-glicerofosfato aciltransferasa. Los estudios de especificidad de ambas fracciones han demostrado que la fracción rica en glicerofosfato aciltransferasa sintetiza únicamente 1-acilglicerofosfato utilizando casi exclusivamente -

acil-CoAs saturados y entre éstos palmitil-CoA y estearil-CoA son las más activas. La fracción rica en la otra transferasa tiene gran especificidad para las acil-CoAs mono- y dienoicas siendo la oleil-CoA la más efectiva. El producto de la reacción es ácido fosfatídico.

Además, estos autores han encontrado en esta fracción de membrana no sólo esta actividad de 1-acil-glicerofosfato aciltransferasa, sino también actividad de 2-acil-glicerofosfato aciltransferasa con una selectividad muy elevada para los ácidos saturados y sobre todo para el esteárico.

En la figura (2) podemos ver un esquema de la formación de triglicéridos y fosfolípidos de acuerdo con las especificidades descritas anteriormente.

Estas especificidades dan la base enzimática al concepto de que la acilación del glicerofosfato para dar ácido fosfatídico es el mecanismo principal para la distribución asimétrica de los ácidos grasos en los glicerolípidos.

Ahora bien, la similitud en la distribución de ácidos grasos no es la única relación entre triglicéridos y fosfolípidos pues como hemos señalado anteriormente ambos se sintetizan a partir de un precursor común, el diglicérido, y es de esperar que exista un mecanismo de regulación de la síntesis de uno u otro glicerolípido a partir del precursor común.

Los ácidos grasos se metabolizan por dos rutas principales: (a) Esterificación para formar triglicéridos, fosfolípidos y otros ésteres y (b) oxidación a CO_2 y cuerpos cetónicos. Actualmente hay datos suficientes para poder afirmar que las cantidades de ácidos grasos que se dirigen a una u otra ruta dependen fundamentalmente del estado nutricional, pero, sin embargo, se conoce bastante poco

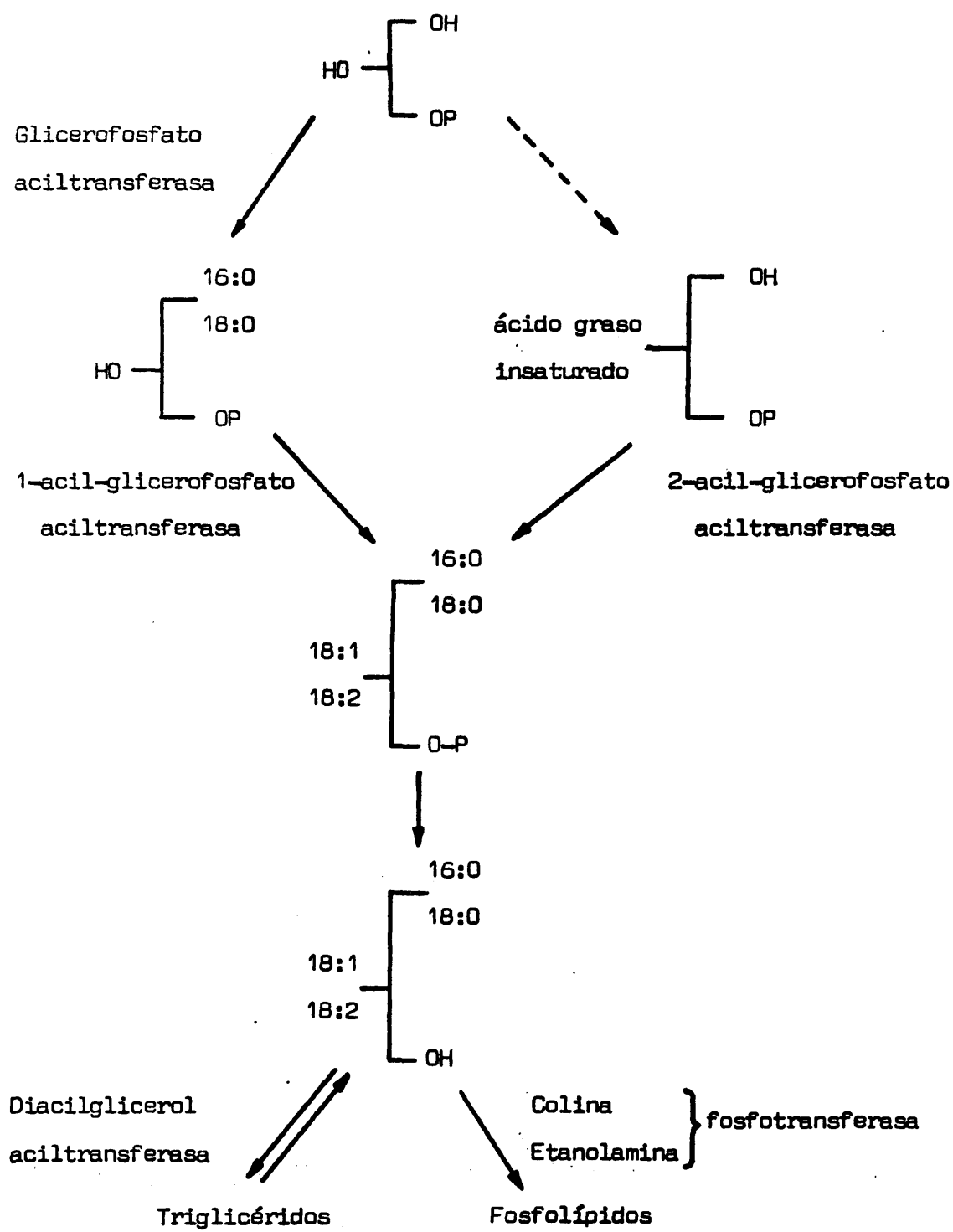


Fig. 2. Ver texto

el mecanismo de regulación de ambas rutas.

Respecto a la ruta de oxidación, los trabajos de Shepherd et al. (1966) parecen sugerir que la etapa limitante es la conversión - de acil-CoA en acilcarnitina.

En la ruta de esterificación, y concretamente en la forma— ción de glicerolípidos, parece que el punto de regulación debería es— tar en la acilación del α -glicerofosfato. Sin embargo, no se ha po— dido demostrar experimentalmente que las aciltransferasas alteren su actividad en distintos estados metabólicos. En contraste con esta im— posibilidad, Fallon et al. (1972) han sugerido que el punto de con— trol debe estar a nivel de la fosfatasa del ácido fosfatídico, enzi— ma que sí responde con cambios sensibles de actividad a distintos es— tículos metabólicos.

Por otro lado, una vez formado el diglicérido la actividad de las enzimas en este punto de ramificación (diglicérido aciltrans— ferasa y colina- o etanolamina-fosfotransferasas) debe ser la que go— bierne la síntesis de triglicéridos o fosfolípidos. Los estudios de Young et al. (1969, 1971a, 1971b) en hígado de ratas sometidas a dis— tintos tratamientos han dado apoyo experimental al concepto de que - estas enzimas son fundamentales como puntos de control no sólo de - los niveles de síntesis de ambas clases de diglicéridos, sino también en la regulación de los niveles de diglicéridos y que, por tanto, pue— den contribuir junto con la fosfatasa en la regulación de la ruta de esterificación de los ácidos grasos.

Experiencias posteriores de Ontko (1972) con células hepáticas aisladas de rata han demostrado que a baja concentración de áci— dos grasos el principal producto de la esterificación son fosfolípi— dos, pero que cuando la concentración de fosfolípidos se acerca a la saturación, se puede observar un incremento sigmoidal de los niveles de diglicéridos y triglicéridos. Estos resultados están de acuerdo -

con las experiencias de Iritani et al. (1974) que demuestran que a bajos niveles de ácidos grasos estos se dirigen fundamentalmente a la - formación de fosfolípidos y que ésta no depende del estado nutricional, mientras que la de triglicéridos depende en gran manera de la - dieta. Esto sugeriría entonces que el principal punto de control de la formación de glicerolípidos estaría a nivel de la diacilglicerol acilltransferasa.

Sin embargo, todos estos datos son sólo fragmentarios y la regulación de la síntesis de glicerolípidos es aún un campo abierto a - posteriores investigaciones que completen los escasos datos de que disponemos actualmente.

1.5 BIOSINTESIS DE FOSFOLÍPIDOS HEPATICOS

El metabolismo de fosfolípidos de todas las células refleja - los procesos de síntesis, degradación y reparación de membranas, pero además, refleja procesos peculiares en cada tipo particular de células, como por ejemplo la célula hepática.

El hígado tiene una velocidad de recambio de fosfolípidos elevada. Parte de estos fosfolípidos son vertidos al plasma, cuyos fosfolípidos circulantes son casi exclusivamente de origen hepático; parte son secretados en la bilis la cual contiene un 30% de fosfolípidos, - sobre todo lecitinas, y finalmente una última fracción da cuenta del metabolismo de la propia célula hepática. Aunque los fosfolípidos de hígado son una mezcla compleja de distintas clases, las lecitinas son los principales fosfolípidos exportados al plasma y la bilis llegando a constituir el 15-20% de las lecitinas totales del tejido.

Dentro del metabolismo de la célula hepática el recambio de - fosfolípidos está implicado no sólo en los procesos de degradación y síntesis de membranas, sino también en procesos particulares del órgano entre los que se pueden citar como fundamentales: (a) la respuesta a la administración de drogas; (b) ser el principal responsable del - metabolismo general en procesos de ayuno prolongado y durante la realimentación y (c) en su poder de regeneración.

No entra dentro del objeto de este trabajo el estudio detallado del metabolismo hepático pero es evidente que los fosfolípidos juegan un papel fundamental en este metabolismo y, consecuentemente, es obvia la importancia del estudio de los mecanismos de su síntesis y modificación en el hígado.

1.5.1 BIOSINTESIS EN ADULTOS

Los ácidos grasos necesarios para la síntesis de lípidos en hígado proceden del "pool" plasmático de ácidos grasos libres en su mayor parte, aunque también pueden proceder de la lipólisis en la superficie de las células hepáticas.

El proceso de captura de ácidos grasos libres incluye dos etapas fundamentales: (a) su unión a la membrana y (b) la esterificación de estos ácidos, de la cual depende la continuación del proceso de captura. Los estudios realizados con ácidos marcados han demostrado que inicialmente se incorporan en fosfolípidos de la membrana plasmática (Higgins y Green, 1967). Los cálculos basados en la vida media de los fosfolípidos de membrana plasmática han permitido sugerir que esta incorporación a fosfolípidos contribuye significativamente al proceso de captura de ácidos grasos por la célula (Wright y Green, 1971).

En general, el hígado posee la mayor parte de las rutas de síntesis de fosfolípidos: acilación de glicerofosfato y fosfodihidroxiacetona, acilación de lisofosfátidos, rutas de la CDP-colina y CDP-etanolamina y mecanismo de intercambio de bases. Además, muestra una gran actividad la ruta de metilación contribuyendo significativamente a la formación de lecitinas (de esta ruta procede el 10-20% de las lecitinas totales) (Björnstad y Bremer, 1966). La contribución de cada una de ellas depende de la clase y especie molecular del fosfolípido sintetizado, si bien la casi totalidad de los estudios realizados se refieren a las clases más abundantes que son la fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina.

La composición de la fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina de hígado en términos de sus especies moleculares está bien establecida por numerosos autores y así se sabe que en hígado de rata la composición es (Arvidson, 1968):

	%	Monoenoica	Dienoica	Tetraenoica	Hexaenoica
Fosfatidilcolina		11,5	25,9	49,6	13,0
Fosfatidiletanolamina		3,6	18,5	49,7	28,2

A pesar de que las especies tetraenoicas son las más abundantes en ambos fosfolípidos el empleo de precursores marcados no da lugar a incorporaciones elevadas en estas especies. Por otra parte, como ya se ha descrito en el apartado 1.4 el ácido araquidónico no se incorpora en el ácido fosfatídico durante su síntesis "de novo" a partir de glicerofosfato lo cual justifica que no haya incorporación de los precursores marcados.

Hill et al. (1968) estudiaron en cortes de hígado de rata la cinética de incorporación de glicerol marcado en especies de fosfatidilcolina y etanolamina observando que el glicerol se incorporaba rápidamente en las especies monoénicas y diénicas de ambos fosfolípidos. Las especies hexaenoicas de la fosfatidiletanolamina también incorporaron el glicerol, mientras que las especies tetraenoicas de ambos fosfolípidos incorporaron el precursor muy lentamente. Resultados parecidos fueron obtenidos por Kanoh(1969) utilizando glicerol, P_i y colina como precursores marcados y por van Golde et al. (1969) con 3H -glicerol y ácido ^{14}C -esteárico. Estos autores concluyeron que la síntesis "de novo" vía ácido fosfatídico no es operativa en la formación de especies tetraenoicas de ambos fosfolípidos.

Los estudios "in vivo" de numerosos autores (Arvidson, 1968a; Arvidson, 1968b; Akesson et al 1970a; Vereyken et al. 1972; Sundler et al. 1972) han confirmado los resultados empleando cortes de tejido demostrando que la ruta de biosíntesis "de novo" da cuenta de la formación de especies mono y dienoicas de fosfatidilcolina y mono, di y hexaenoicas de fosfatidiletanolamina.

Respecto a las especies individuales los estudios de Arvidson (1968b) en rata empleando colina marcada como precursor han demostrado que las especies que más rápidamente incorporan el precursor son las 1-palmitil-2-oleil y 1-palmitil-2-linoleil-fosfatidilcolinas, - mientras que la especie 1-estearil-2-araquidonil es la que incorpora más lentamente la colina marcada. Estos resultados han sido confirmados por otros autores (Sundler et al. 1972; Akesson, 1970; Trehwella y Collins, 1973a, 1973b).

Asimismo, se va acumulando cada día más evidencia de que las especies tetraenoicas y probablemente las 1-estearil se sintetizan - por un mecanismo de desacilación-reacilación. Los estudios de Kanoh, (1969) van Golde et al. (1969), Akesson et al. (1970b) y Akesson - (1970) tanto "in vitro" como "in vivo" han demostrado que las especies tetraenoicas de ambos fosfolípidos se sintetizan por acilación de los lisofosfolípidos endógenos. Las especies que contienen esteárico se sintetizan en parte por un mecanismo de desacilación-reacilación similar al de las especies tetraenoicas.

Las otras rutas de biosíntesis, metilación e intercambio de - bases no tiene gran significación cuantitativa en la síntesis de - - fosfatidilcolina y etanolamina aunque pueden tenerla en la de otros fosfolípidos minoritarios, p.e. fosfatidilserina (veánse apartados - 1.3.3 y 1.3.4). Recientemente Sundler et al. (1974) han observado que el intercambio de bases origina como máximo el 8-9% de la fosfatidiletanolamina en hepatocitos aislados de rata, a concentraciones fisiológicas de sustratos, porcentaje que se eleva a un 30-40% a concentraciones muy superiores a las fisiológicas.

Como se ha señalado anteriormente los fosfolípidos hepáticos se pueden clasificar en tres pools diferentes: plasmático, biliar y celular. Estos pools pueden distinguirse no sólo por su distinta localización después de su síntesis, sino también porque sus velocidades de recambio son diferentes.

Así, los primeros experimentos de Zilversmit y Hendel (1958) utilizando ^{32}P como precursor radiactivo demostraron que los fosfolípidos biliares aumentan su actividad específica mucho más rápidamente que los plasmáticos y los celulares. Como parece poco probable que los precursores de fosfolípidos hepáticos sean los biliares, es evidente que estos muestran una velocidad de recambio superior a aquellos. Experimentos posteriores (Swell et al., 1968) demostraron que las lecitinas biliares son la clase con mayor velocidad de recambio, mientras que en orgánulos celulares o en plasma la velocidad de recambio de lecitinas es similar a la de otras clases de fosfolípidos.

Los estudios de Balint et al. (1965, 1967) han puesto de manifiesto que, en lecitinas biliares, exhiben mayor velocidad de recambio las especies que contienen ácido linoleico, velocidad muy superior a las linoleil-lecitinas plasmáticas o celulares. En el mismo estudio se puso de manifiesto que la fosfatidiletanolamina biliar incorpora menos precursor marcado que la fosfatidilcolina lo cual sugiere que la ruta de metilación no tiene gran significación cuantitativa en la biosíntesis de lecitinas biliares. Además estos autores encontraron diferencias en la composición de ácidos grasos de los diferentes pools de lecitina. Las biliares contienen fundamentalmente especies palmitoil-linoleil, mientras que las de plasma y tejido tienen porcentajes más elevados de esteárico y araquidónico.

En este sentido es interesante hacer notar que la gran similitud en el grado de insaturación de las lecitinas biliares y las de membrana de los canalículos biliares, grado de insaturación muy inferior al de lecitinas plasmáticas y celulares, ha permitido sugerir que el origen de estas lecitinas biliares puede ser la membrana de estos canículos. De hecho, la preparación de fracciones purificadas de estas membranas han conducido a observar que su contenido en palmitoil-linoleil-lecitina es elevado (Pfleger et al., 1968) dato que apoyaría esta supo

sición. La diferencia de composición de ácidos grasos entre lecitinas plasmáticas y celulares no es muy grande, lo cual está de acuerdo con el rápido intercambio observado entre ambas (Zilversmit, 1971) y esto sugeriría una localización común en su síntesis.

1.5.2 BIOSÍNTESIS EN FETOS

Los ácidos grasos fetales tienen un triple origen (véase apartado 1.6.2), aunque la mayor parte de ellos procede de la madre por transporte a través de la placenta. Este transporte de ácidos grasos libres a través de la placenta muestra grandes diferencias de unas especies a otras, y así, por ejemplo, en conejo y cobaya es bastante considerable, mientras que en cordero es relativamente bajo y además hay diferencias de permeabilidad entre distintos ácidos grasos (van Duyn, 1962; McBride, 1964; Noble, 1971b.)

Recientemente, Hummel et al., (1974a) ha demostrado, utilizando ácidos grasos marcados, que en fetos de rata los ácidos grasos inyectados en la circulación materna aparecen en pocos segundos en la circulación fetal, atravesando la placenta sin esterificarse. Estos ácidos grasos son utilizados posteriormente por el feto para la síntesis de triglicéridos y fosfolípidos y tienen un turnover muy rápido (0,3 min.). Además han demostrado que la síntesis endógena de ácidos grasos es cuantitativamente despreciable en feto de rata.

La información que se posee sobre la síntesis hepática de fosfolípidos en fetos es muy fragmentaria y análogamente al transporte placentario de ácidos grasos muestra bastantes diferencias de unas especies a otras, al menos en el origen de los fosfolípidos plasmáticos que son los más estudiados.

Biezenski(1969), investigando conejos, puso de manifiesto la -

imposibilidad del hígado fetal de sintetizar fosfolípidos de plasma: inyectando $^{32}\text{PO}_4^{-3}$ a fetos extraídos de la madre al final de la gestación, observó una rápida incorporación en fosfolípidos de hígado y carcasa fetales; sin embargo, no se produjo ninguna incorporación en fosfolípidos de plasma hasta tres horas después de la inyección. Un experimento análogo lo realizó con conejos adultos normales, obteniendo una rápida incorporación en fosfolípidos plasmáticos. La consecuencia probable es que el hígado fetal no sintetiza fosfolípidos de plasma hasta varias horas después del nacimiento, y puesto que ningún ácido graso esterificado se transfiere directamente al feto (Biezenski, 1962; McBride, 1964; Biezenski et al., 1971), se comprende que sea la placenta la principal fuente de fosfolípidos fetales. Biezenski (1970; 1971) concluye que en la primera etapa de la gestación la principal fuente de fosfolípidos fetales es el plasma materno, mientras que en la última etapa es la placenta, apuntando además la posibilidad de que fragmentos de fosfolípidos de origen materno pasen también a la circulación fetal incorporándose en lípidos de diferentes tejidos fetales.

En contraste con estos resultados obtenidos en conejos, Hummel et al., (1974b) han encontrado que en fetos de rata los fosfolípidos plasmáticos tienen su origen fundamentalmente en el hígado fetal, con un turnover respecto al fragmento de ácidos grasos de la molécula muy pequeño (17 min.), y que sólo una pequeña parte (menos del 5%) de los fosfolípidos fetales proceden de la placenta o del suero materno.

1.6 BIOSINTESIS DE FOSFOLÍPIDOS PULMONARES

La noción de que el pulmón era un órgano sin una actividad metabólica elevada dominó el pensamiento bioquímico hasta el año 1965. Únicamente en la última década se ha admitido que la extremadamente compleja mecánica pulmonar depende de su metabolismo y que la secreción exocrina del pulmón es esencial para la supervivencia del organismo. Al mismo tiempo, el pulmón tiene una posición y está estructurado en una forma ideal para el intercambio de sustancias vasoactivas y hormonas con el sistema circulatorio. Si a esto añadimos que el pulmón es un órgano vital en el momento del nacimiento, es fácil comprender el interés que tiene el conocimiento de su metabolismo, tema que ha recibido gran atención en los últimos años por parte de numerosos investigadores.

El cociente respiratorio del pulmón es aproximadamente el 70 % del hepático, y sus requerimientos de oxígeno varían entre el 1 y el 2% del total del organismo. (Krebs, 1950).

La velocidad de oxidación y síntesis de lípidos es comparable a la del hígado. El pulmón oxida ácido palmítico, su principal fuente de energía, más activamente que otros órganos incluyendo el corazón o el hígado. El acetato es oxidado más rápidamente en cortes de pulmón — que en cortes de hígado. (Felts, 1965). Pero el aspecto más sorprendente del metabolismo pulmonar es su prodigiosa capacidad para la síntesis de lípidos. El pulmón es capaz de incorporar acetato y ácidos grasos de la sangre en fosfolípidos mucho más rápidamente que el hígado (Harlan, et al., 1966). Los productos de esta actividad sintética del pulmón son únicos y tienen funciones fisiológicas muy definidas e importantes. La glicolisis y posterior utilización del α -glicerofosfato ocurren a velocidades comparables en pulmón e hígado.

Este metabolismo lipídico tan activo está relacionado con la elaboración de un material de recubrimiento alveolar que protege a los alveolos del colapso mediante un descenso en la tensión superficial de la interfase aire-líquido durante la respiración. Un activo metabolismo oxidativo suministra la energía necesaria para esta síntesis y también para la elevada capacidad fagocítica del pulmón. Además el tejido pulmonar tiene una sorprendente capacidad para alterar el flujo y la presión sanguíneos, hasta el punto de que extractos tan pequeños como 5 mg. de pulmón son capaces de alterar profundamente la presión arterial. La demostración de esta actividad vasoactiva y la existencia de numerosas células con capacidad de secretar histamina sugieren que el pulmón puede jugar un papel importante en la regulación del flujo sanguíneo.

La estructura alveolar de los pulmones de los mamíferos es ventajosa para un intercambio gaseoso eficiente, pero la gran arborización de estos alveolos presenta problemas en el mantenimiento de su estabilidad. Alveolos de distinto tamaño están comunicados entre sí y al cambiar sus dimensiones durante el ciclo respiratorio las fuerzas físicas provocarían el colapso de los más pequeños, sobre todo durante la espiración.

Si este suceso no ocurre es debido a la existencia de una película que recubre la superficie alveolar, disminuyendo la tensión superficial de la interfase aire-líquido y que trabajando en conjunto con la elasticidad del tejido impide el colapso del alveolo. Todas las especies con estructura alveolar tienen este recubrimiento y en su ausencia los pulmones sufren colapsos alveolares y atelectasis. Pero no es esta la única misión de este recubrimiento pues también contribuyen junto con el tejido y la presión oncótica del plasma, a evitar la efusión de éste en los espacios alveolares.

La noción de surfactante pulmonar fue dada ya en 1929 por van Neergard pero no ha sido emprendida hasta los últimos años la investigación sistemática de su estructura y síntesis.

Los extractos de fluido alveolar o la espuma pulmonar demuestran un contenido muy elevado en lípidos (del orden del 70%) y dentro de estos la especie más abundante es la de los fosfolípidos que comprenden el 74% del total junto con colesterol (8%), triglicéridos (10%) y ácidos grasos libres (8%) como componentes minoritarios (Klaus et al., 1961). De éstos, sólo los fosfolípidos son capaces de disminuir la tensión superficial y dentro de ellos las lecitinas muestran una mayor actividad superficial aunque otros autores han descrito que esfingomielinas y dimetilfosfatidiletanolaminas también exhiben actividad superficial (Gluck et al., 1967; Watkins, 1968). Como la lecitina es el lípido más abundante en los extractos alveolares (55% del total) Klaus le asignó el papel principal en la actividad superficial del pulmón.

Varios autores (Morgan et al., 1966; King y Clements, 1972; Young y Tierney, 1972) han demostrado además que las lecitinas saturadas y concretamente la 1,2-dipalmitoil-3-sn-fosfatidilcolina (que es el componente mayoritario) son los únicos fosfolípidos presentes en cantidad suficiente para recubrir por completo la superficie de los alveolos.

Por otro lado, se ha demostrado que existe una estrecha relación entre el contenido de dipalmitoil-lecitina y la resistencia del alveolo al colapso (Brumley et al., 1967). Asimismo el tratamiento con fosfolipasa C hace disminuir rápidamente la actividad superficial del pulmón (Tierney y Johnson, 1966).

El análisis de la composición de ácidos grasos de las lecitinas

nas "alveolares" confirma estos hechos pues el 78% de ellos son saturados con un 66% de palmítico. Además la especie molecular más abundante es la dipalmitoil-lecitina (40%) seguida de la palmitoil-oleoil-lecitina (Morgan, 1965).

Harlan (1973) ha revisado estos datos y hace un estudio teórico muy interesante sobre la estructura de estos surfactantes y la formación de monocapas, concluyendo que la estructura más favorable de una monocapa para que su tensión superficial sea mínima, es cuando los dos ácidos grasos son saturados y el fragmento polar del fosfolípido se dispone en forma coaxial.

No son, sin embargo, los fosfolípidos los únicos componentes del surfactante pulmonar pues al fraccionar la espuma pulmonar mediante ultracentrifugación preparativa o electroforesis, se puede comprobar que los fosfolípidos van asociados a una proteína que muestra movilidad α_2 . (Clements, 1968). Este componente proteico representa el 5% de la espuma pulmonar y su misión está sometida a considerables controversias por parte de los distintos autores. Watkins (1968) sugiere que su misión puede ser mantener los lípidos en un estado fluido durante la compresión y quizás dispersar micelas lipídicas que se pueden formar, para que sean reabsorbidas por la monocapa durante la expansión.

King y Clemens (1972a, 1972b y 1972c) han aislado una lipoproteína con actividad superficial elevada que contiene un 73-78% de lecitinas, y dentro de ellas las especies más abundantes son las saturadas (40%). Sin embargo, otros autores (Scarpelli et al., 1967; Stein et al., 1969; Scarpelli et al., 1970) no han encontrado fracción proteica en extractos alveolares con actividad superficial. Queda, pues, abierto a posteriores investigaciones la confirmación de la existencia de esta lipoproteína y el esclarecimiento de su posi-

ble misión en el surfactante pulmonar.

En cuanto a la localización de la biosíntesis del surfactante hay un elevado número de datos que asignar esta síntesis a las células alveolares grandes (pneumocitos tipo II, pneumocitos granulares, células septales), células que aunque presentes en pequeña cantidad (sólo hay 6 ó 7 en cada alveolo) tienen una extraordinaria actividad sintética de lípidos. Estas células están presentes en pulmones fetales maduros y en pulmones adultos, pero no en pulmones fetales inmaduros, y la aparición de inclusiones citoplasmáticas en estas células coincide con la aparición del surfactante en los lavados alveolares. Buckingham (1964, 1966) ha demostrado que el ácido palmítico radioactivo se acumula en estas células junto a las inclusiones citoplasmáticas y que después este ácido se recupera como palmitoil-lecitina.

El surfactante sintetizado en estas células debe ser secretado al espacio alveolar. El mecanismo de secreción está en fase de estudio y sólo se conoce parcialmente. Klaus (1962) sugirió que los cuerpos lamelares que se forman en los pneumocitos tipo II contenían el surfactante y eran los destinados a secretarlos en la superficie alveolar. Aunque algunos autores sugerían que estos cuerpos lamelares eran ingeridos por la célula, numerosos trabajos de micrografía electrónica demostraron, que, en realidad, abandonan la célula (Askin y Kohn, 1971). Mediante la utilización de diversos precursores radioactivos y técnicas de autoradiografía, otros autores (Massaro y Massaro, 1972; Chevalier y Collet, 1972) han demostrado que estos cuerpos lamelares acumulan fosfolípidos en el retículo endoplásmico rugoso y una vez formados se dirigen a la superficie de la célula, donde vierten su contenido en los espacios alveolares.

Actualmente se piensa que las evidencias más directas sobre la secreción del surfactante pueden obtenerse aislando las células pulmonares en tipos individuales; Kikkawa y Yoneda (1973) han aborda-

do esta vía y en sus primeros resultados parece que han llegado a aislar una fracción de pneumocitos tipo II relativamente pura. Es de esperar que estos estudios permitirán aclarar el proceso de secreción del surfactante pulmonar.

Por otro lado, el turnover del surfactante pulmonar es relativamente rápido pues la vida media de las lecitinas pulmonares es aproximadamente de 14 horas (Tierney et al., 1967), aunque el sitio y forma de degradación es desconocido. Se supone que una de las formas puede ser a través de las células fagocíticas alveolares, que poseen un gran espectro enzimático, entre los cuales se incluyen las enzimas capaces de degradar lecitinas. También el elevado drenaje linfático del pulmón puede ser otro mecanismo de absorción del surfactante, aunque ninguno de estos mecanismos ha podido ser demostrado experimentalmente.

1.6.1 BIOSÍNTESIS EN ADULTOS

La biosíntesis de fosfolípidos en pulmón y particularmente la de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina ha sido extensamente estudiada en los últimos años por numerosos autores, sobre todo desde que se demostró la importancia de la dipalmitoil-lecitina para la funcionalidad pulmonar.

Los ácidos grasos para la biosíntesis de fosfolípidos en pulmón pueden proceder de los ácidos grasos libres de la sangre que son ávidamente extraídos por el pulmón, sobre todo el palmítico (Harlan, 1966). Existen, sin embargo, otros caminos para la obtención de ácidos grasos y así Heinemann (1961) demostró que la lipoproteína lipasa está presente abundantemente en el endotelio capilar del pulmón, y además pueden ser sintetizados por las rutas habituales en las células del pulmón. Felts (1965) ha demostrado que tanto la biosíntesis

"de novo" como la elongación son rutas de biosíntesis de ácidos grasos operativas en el pulmón, con la particularidad de no encontrarse afectadas por la insulina. Los datos actualmente conocidos no permiten evaluar, entre las descritas, cual es la ruta principal de obtención de los ácidos grasos para su incorporación en los fosfolípidos pulmonares.

Morgan (1966) fue el primero en observar la existencia de una diferencia fundamental en la composición de fosfolípidos en homogeneizados de pulmón y fluido alveolar en perros. Al mismo tiempo demostró que el 5% de los fosfolípidos de pulmón puede ser un metabolito intermediario entre fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina, la fosfatidildimetiletanolamina. Asimismo observó una composición de ácidos grasos muy parecida en fosfatidildimetiletanolaminas y lecitinas saturadas.

Weinhold y Vilee (1965) encontraron que la incorporación de ^{32}P en cortes de pulmón de rata era lenta para la fosfatidiletanolamina pero muy rápida para un componente no identificado que mostraba características cromatográficas similares a las de la fosfatidildimetiletanolamina. Ello demostraba que la fosfatidiletanolamina se sintetiza vía "de novo" y que parte de ella se metila posteriormente a fosfatidildimetiletanolamina, la cual podía dar fosfatidilcolina por una posterior metilación. Por lo tanto, la ruta de metilación sería en cierta medida operativa en el esquema de la biosíntesis de lecitinas saturadas en pulmón.

Esta suposición parecía apoyada por las experiencias de Scarpelli (1968) en las cuales el palmitato- ^{14}C inyectado por vía intravenosa en corderos aparece primero en fosfatidiletanolamina y luego en fosfatidilcolina de pulmón.

Sin embargo, Weinhold (1968) utilizando precursores radioac-

tivos demostró que en pulmón de rata la ruta principal de síntesis de lecitinas es la vía CDP-colina y que, cuantitativamente, contribuye - muy poco la ruta de metilación. Posteriores experimentos (Wolfe et al. 1970; Morgan, 1971) confirmaron este hecho, pero Morgan sugiere que, a pesar de ser la ruta de metilación cuantitativamente poco importante en la síntesis de lecitinas totales, su contribución a la síntesis de dipalmitoil-lecitina puede ser esencial.

Por otro lado, DiAgustine (1971) observó una incorporación más rápida de oleico-¹⁴C en fosfatidiletanolamina que en su dimetil derivado, lo cual indicaría que este es selectivamente saturado. Sin embargo, no encontró evidencia de que fuera un intermedio en la síntesis de lecitinas, sino más bien un producto biosintético, sugiriendo la posibilidad de que pudiera ser un donador de palmitoilos en reacciones de transacilación.

Esta síntesis por un mecanismo desacilación-reacilación había sido sugerida por Montfoort (1970) como una ruta alternativa para la biosíntesis de lecitinas saturadas en pulmón. Frosolono et al. (1971) encontraron esta ruta de desacilación-reacilación en pulmón de perro, demostrando que al pH del espacio pulmonar extravascular (=6,69; Effros y Chinard, 1969) la actividad de estas aciltransferasas es el 80% de su actividad máxima medida "in vitro" a pH 7,4. Asimismo demostraron la existencia de una elevada especificidad de la reacción para el ácido palmítico, el cual se incorpora a doble velocidad que el ácido esteárico. Utilizando 1-acil-2-lisofosfatidilcolina y 1-liso-2-acilfosfatidilcolina no se observa especificidad respecto a la posición a esterificar tanto para el palmítico como para el esteárico, aunque sí hay diferencias si se utiliza un ácido insaturado. Así se encuentra que la posición 1 es esterificada a la misma velocidad con palmítico y palmitoleico, mientras que la posición 2 muestra preferencia por el ácido insaturado. Lo mismo ocurre

si se comparan esteárico con oleico. Estos hechos están de acuerdo con resultados anteriores de Brandt y Lands (1967) al concluir que en esta reacción de acilación es mucho más importante la posición a esterificar que el ácido ya presente en el liso derivado. Además en ambos trabajos se demostró la escasa significación de la posible emigración del acilo, entre ambas posiciones, durante la reacción.

Varios autores (Akino et al., 1971; Vereyken et al., 1972) - han estudiado las distintas rutas de síntesis de especies moleculares de lecitinas en pulmón de rata. De sus resultados se deduce que las especies saturadas se sintetizan preferentemente por la ruta "de novo" vía CDP-colina, siguiéndole en importancia la acilación de las lisolecitinas y la transacilación entre dos moléculas de lisolecitina. Este último mecanismo es al que Akino asigna el papel principal en la síntesis de dipalmitoil-lecitina, de acuerdo con sus resultados experimentales, pero Vereyken discute este mecanismo como cuantitativamente importante "in vivo".

Las especies insaturadas se sintetizan predominantemente por la ruta de la CDP-colina y sólo tiene alguna importancia el mecanismo de desacilación-reacilación en la síntesis de las especies monoenoicas.

De acuerdo con las experiencias de Frosolono anteriormente - descritas (1971) no encuentran una especificidad de los ácidos insaturados por la posición 2, que es acilada a la misma velocidad por palmítico y linoleico. Asimismo y de acuerdo con los datos de otros autores no encuentran una significación cuantitativa elevada a la ruta de metilación de la fosfatidiletanolamina.

Además estas experiencias permitieron calcular a ambos autores la velocidad de recambio de las lecitinas pulmonares, que había sido evaluada en 14 hr. para todas las especies y todos los fragmentos de la molécula (glicerol, ácido graso, fosfórico y base nitrogenada), (Tierney et al., 1967). Los resultados obtenidos difieren de estos en

el sentido de que esta velocidad de recambio no parece ser homogénea y ambos autores encuentran una velocidad de recambio mayor para las especies insaturadas, sobre todo dienoicas y trienoicas. Toshima et al. (1972) han revisado experimentalmente estas velocidades de recambio - y han aportado datos que se pueden considerar intermedios entre los - de Tierney y los de Akino y Vereyken encontrando una cierta homogeneidad, pero no absoluta, pues los distintos fragmentos de la molécula - se recambian a velocidades diferentes. Lo que sí parece sólidamente establecido es que las lecitinas "alveolares" y especialmente las saturadas se recambian a velocidades muy superiores a las del tejido pulmonar.

Recientemente Kiey-Aboagye y col. (1973) han observado que el palmitato se incorpora a lecitinas endógenas en la posición 2 fundamentalmente, en un mecanismo de desacilación-reacilación y que la especie que muestra mayor actividad de intercambio es la 1-palmitoil-2-oleil-3-sn-glicerofosforil colina. Interpretan este resultado en - función de una actividad de fosfolipasa A₂ activada por Ca²⁺ que es - mayor para las especies con un ácido insaturado en la posición 2 ya - que las lecitinas saturadas son más resistentes a la acción de la fosfolipasa (Moore y Williams, 1963). De hecho encuentran que esta acilación con palmitato requiere la presencia de iones calcio.

Se ha estudiado, asimismo, (Tombropoulos, 1973) la contribución de distintas fracciones subcelulares en la síntesis de glicerolípidos en pulmón de hamster. La incorporación de palmítico a distintas clases de lípidos tiene lugar en fracción mitocondrial y microsomal, siendo esta última la que muestra una mayor actividad. La biosíntesis se estimula por la fracción soluble y en su presencia, con - rac-glicerofosfato como sustrato, se incrementa grandemente la incorporación de palmítico; ello indica que la fracción soluble favorece - la ruta de biosíntesis "de novo" en ambas preparaciones de partículas.

En fosfolípidos se encuentran mayores diferencias entre ambas fracciones subcelulares, diferencias debidas a que la mayoría de las enzimas responsables de la síntesis de fosfolípidos se hallan en la fracción microsomal. La baja incorporación de glicerofosfato- ^{14}C en fosfatidilcolina en ambas fracciones sugiere que el nivel de síntesis de éstas, vía "de novo" es muy bajo, lo cual está en contra de resultados de otros autores anteriormente expuestos. Posiblemente se modifican las lecitinas endógenas por otras rutas. Sin embargo, se observó que la biosíntesis de fosfatidiletanolamina transcurre principalmente por la vía "de novo".

Por otro lado, se ha encontrado en la fracción sobrenadante de 100.000 g de pulmón de rata una actividad de aciltransferasa entre dos moléculas de lisolecitina (Abe et al., 1972; Abe y Akino, 1973) y la enzima ha sido parcialmente purificada (Abe et al., 1974). Parece altamente probable que esta enzima contribuya a la formación de lecitinas saturadas a partir de lisolecitinas exógenas suministradas por la circulación o el medio de incubación. El encontrar también en este sobrenadante una fosfolipasa A_2 (Ohta et al., 1972) ha llevado a sugerir que la acción combinada de las dos enzimas puede ser la responsable de la transformación de las lecitinas no saturadas en saturadas y este sería el mecanismo principal de mantenimiento de los elevados niveles de dipalmitoil-lecitina en pulmón.

Estos experimentos y otros posteriores (Moriya y Kanoh, 1974) contrastan con las experiencias de Vereyken et al., pues estos últimos autores, en experiencias "in vivo" con palmitato- ^{14}C y glicerol- ^3H - utilizando las velocidades de recambio calculadas por Ohno et al. (1974), han demostrado que las lecitinas mono y dienoicas se sintetizan preferentemente por la ruta "de novo", mientras que las saturadas y las tetraenoicas lo hacen por rutas distintas de la "de novo".

Hasegawa-Sasaki y Ohno (1975) han encontrado en fracción microsomal — de pulmón de rata dos 1-acil-3-sn-glicerofosforilcolina:acil-CoA transferasa distintas. Una específica de palmitoil-CoA que se inhibe por — otras acil-CoA y por exceso de palmitoil-CoA, con una K_m idéntica a la comunicada por otros autores en hígado. Otra, específica de araquidon-oil-CoA, que no se inhibe por otras acil-CoA, excepto ligeramente por linoleil-CoA, y que es similar a la encontrada por Yamasita et al. — (1973) en hígado, aunque con una K_m mucho mayor para el acil-CoA.

Los resultados obtenidos por estos autores confirman que esta — segunda aciltransferasa puede ser la principal responsable de la síntesis de lecitinas tetraenoicas. Por otro lado, concluyen que si bien la palmitoil-CoA:1-acil-3-sn-glicerofosforilcolina aciltransferasa puede ser responsable de la síntesis de dipalmitoil-lecitina no se puede ad—mitir que sea la única responsable, como sugirieron Vereyken y Frosolo—no, ya que su relativamente baja actividad no puede justificar los elevados niveles de dipalmitoil-lecitina encontrados en pulmón y su elevada velocidad de recambio, siendo necesario admitir, por lo tanto, la — existencia de otros mecanismos que mantengan estos niveles.

1.6.2 BIOSÍNTESIS EN FETOS

La biosíntesis de fosfolípidos pulmonares en el feto es esen—cial, sobre todo en los momentos anteriores y posteriores al nacimien—to en los cuales, al comenzar la respiración, se debe secretar a los — espacios alveolares la totalidad del surfactante pulmonar. Este es uno de los momentos cruciales del desarrollo, pues de una correcta activi—dad biosintética y secretora depende la supervivencia después del naci—miento.

Los ácidos grasos que utiliza el feto para la biosíntesis de —

fosfolípidos pulmonares pueden proceder, bien de los ácidos grasos li bres circulantes de la sangre fetal, los cuales tienen a su vez tri— ple origen: materno, placentario y biosintetizados por el propio feto (Popják, 1950; van Duyne, 1959, 1962) o bien de los triglicéridos fe— tales, originados en su mayor parte en la placenta. Como ocurre en el caso del pulmón adulto no existen datos que permitan decidir cual es la principal fuente de ácidos grasos en el pulmón fetal. Es importan— te tener en cuenta, por último, la importancia, al menos cualitativa, del transporte de ácidos grasos poliinsaturados esenciales de la ma— dre al feto (Dancis, 1962).

Las experiencias iniciales en cordero demostraron que a lo — largo de la gestación se incrementan los niveles de fosfolípidos en — pulmón, y que este aumento es máximo en la fracción de lecitinas (Chida et al., 1966).

Estos datos fueron confirmados por Gluck et al. (1967b) en — pulmón fetal de conejo. En el feto a término fosfatidilcolina, esfingomielina y fosfatidilinositol dan cuenta del 70% de los lípidos, siendo la fosfatidilcolina la más abundante (50%). No se ha podido — identificar fosfatidildimetiletanolamina en tejido ni en lavado alveo— lar; este fosfolípido sólo aparece al cabo de una semana del nacimien— to.

En las rutas estudiadas "in vitro" se encontró que la sínte— sis de fosfatidiletanolamina transcurre casi exclusivamente por la — vía CDP-etanolamina, mostrando la máxima actividad entre los días 25-26 de la gestación. La otra ruta, incorporación de serina y descarbo— xilación posterior, no tiene importancia significativa.

La fosfatidilcolina se sintetiza preferentemente por la ruta CDP-colina, con una disminución progresiva de la actividad según va —

avanzando la gestación, mientras que la ruta de metilación muestra un máximo significativo entre los días 28-29 de gestación.

Utilizando una técnica de precipitación de lecitinas "activas" con acetona fría (Gluck et al., 1967a), demuestran que las lecitinas con actividad surfactante están presentes en el parénquima pulmonar - bastante antes del día 29 que es cuando son liberadas al espacio alveolar. El incremento de lecitinas que tiene lugar a lo largo de la gestación, hasta el día 28, es fundamentalmente de fracción soluble y por lo tanto no "activa", mientras que a partir del día 29 se observa un gran incremento en la fracción insoluble.

En el pulmón del feto a término sólo el 11% de la lecitina alveolar es "activa". Sin embargo, en homogeneizados de tejido se observa que el contenido de lecitina "activa" es del 50%. Esto apoya la suposición de que al acercarse el momento del nacimiento el pulmón - acumula grandes cantidades de surfactante en el parénquima. Entre los días 29-31 estos niveles continúan aumentando hasta el 300% de los - iniciales.

Después del nacimiento siguen aumentando los niveles de lecitina, sobre todo en el fluido alveolar, en el que el incremento de lecitinas totales es de 3 a 5 veces después de una hora de respiración. De estas lecitinas totales las que más se incrementan son las "activas" que aumentan 20-30 veces su nivel en el fluido alveolar al cabo de una hora del nacimiento. Esto sugiere que este almacenamiento de lecitinas "activas" en el parénquima pulmonar tiene la misión de liberar estas lecitinas en grandes cantidades a los espacios alveolares - en el momento del nacimiento.

En experiencias realizadas "in vivo" se demostró que los fetos de 28 días (al principio del día 29) liberados por cesárea pudieron sobrevivir, si bien sufrieron un proceso de insuficiencia respira

toria, y sintetizaron el 90% de su lecitina "activa" por la ruta "de novo" en una hora. El 10% restante se sintetizó por la vía de metilación. Sin embargo, en estos fetos el contenido total de lecitina "activa" en fluido alveolar era un 80% inferior al de un feto maduro con una hora de respiración.

En los fetos maduros, a término, la lecitina "activa" se incrementó de un 11% a un 50% en el fluido alveolar. Como en los fetos de 28 días el 90% de la síntesis tuvo lugar por la ruta "de novo" y sólo un 10% por la ruta de metilación.

Por otro lado, en un estudio posterior (Gluck et al., 1970) se observó que estos cambios en los porcentajes de lecitinas con actividad superficial van asociados con cambios en los ácidos grasos constituyentes de la molécula y que el aumento de la proporción de lecitina "activa" lleva consigo un aumento muy grande en el porcentaje de las especies saturadas, sobre todo la dipalmitoil-lecitina. Además caracterizaron un hecho importante y es que en la fosfatidildimetiletanolamina que aparece después del nacimiento, según se va aproximando la composición del surfactante a la del adulto, la especie más abundante es la 1-palmitoil-2-miristoil-fosfatidildimetiletanolamina. Como este fosfolípido puede originar posteriormente fosfatidilcolina, concluyen que la presencia de un palmítico o un mirístico en la posición 2 condiciona la ruta de biosíntesis y que las especies dipalmitoil se sintetizan vía "de novo" y las palmitoil-miristoil por la vía de metilación.

Además Gluck et al. (1972) estudiando la síntesis de estas especies en fetos y recién nacidos humanos han propuesto que la ruta de metilación predomina hasta las semanas 35-37 de gestación y por lo tanto esta ruta, y su producción de 1-palmitoil-2-miristoil-lecitina puede ser esencial para la supervivencia del feto en los nacimientos prematuros. En apoyo de esta suposición, Morgan (1971) ha demostrado -

que la actividad de la N-metiltransferasa en pulmón fetal de cordero se triplica en el último tercio de la gestación, disminuyendo justamente antes del nacimiento.

Zachman (1971, 1972) ha estudiado en pulmón humano la actividad de las enzimas de la síntesis de lecitinas por ambas rutas. Respecto de la ruta "de novo" sus resultados contrastan con los de Gluck, ya que encuentra que la actividad de la colina quinasa es mayor en los niños prematuros que en los de gestación normal. En rata, sin embargo, hay datos que indican que la actividad de las tres enzimas implicadas en la ruta de la CDP-colina (colina quinasa, citidiltransferasa y colina fosfotransferasa) alcanzan su actividad máxima en el momento del nacimiento (Artom, 1968; Weinhold, 1968; Zachman et al., 1969). Respecto a la reacción de metilación Zachman concluye que en el pulmón de feto humano o recién nacido no tiene prácticamente significación cuantitativa, lo que contrasta también con los datos de Gluck et al.

No debemos olvidar tampoco la posible contribución del mecanismo de desacilación-reacilación en la síntesis de lecitinas fetales, aunque se supone generalmente que este mecanismo tiene más importancia en el adulto para mantener los elevados niveles de lecitinas saturadas. Recientemente Abe et al. (1973) ha caracterizado en pulmón fetal de conejo actividades de aciltransferasa que catalizan la acilación de lisolecitinas o la transacilación entre dos lisolecitinas.

1.7 ACCIONES DE LA INSULINA SOBRE EL METABOLISMO LIPIDICO

1.7.1 EFECTO SOBRE LOS NIVELES DE LIPIDOS PLASMATICOS

Uno de los efectos más claros e inmediatos de la administración "in vivo" de la insulina es el descenso en los niveles en suero de ácidos grasos libres y glicerol, metabolitos cuyo aporte más importante cuantitativamente procede del tejido adiposo; este efecto, ampliamente documentado, se atribuye fundamentalmente a la acción antilipolítica de la insulina en el tejido adiposo.

Existe un número relativamente escaso de datos acerca del efecto de la insulina sobre los niveles de triglicéridos en suero humano no diabético. Jones y Arky (1965) han descrito que en humanos normales una única inyección de insulina no altera los niveles de triglicéridos en suero, pero una infusión prolongada de la hormona origina un notable descenso de estos niveles. En mujeres, tanto gestantes como no gestantes, se produce un marcado descenso de los triglicéridos en suero tres horas después de una única inyección intravenosa de insulina (Dannenburg y Burt, 1965). Asimismo, la inyección de insulina a ratas ayunadas provoca un descenso en la liberación de triglicéridos hepáticos al plasma, efecto que puede ser interpretado como debido a un descenso en el flujo de ácidos grasos procedentes del tejido adiposo hacia la síntesis hepática de triglicéridos para su secreción al plasma (Alcindor et al. 1973).

1.7.2 EFECTO SOBRE LA SINTESIS HEPATICA DE ACIDOS GRASOS

La lipogénesis hepática está inhibida en ratas sometidas a ayuno y en ratas a las que se ha provocado diabetes aloxánica, y esta inhibición es debida a una disminución en los niveles de acetil-CoA carboxilasa y de ácido graso sintetasa; estas actividades recuperan sus

valores normales por administración de insulina (Gonçalves et al., - 1972).

Haft (1967) ha encontrado que cuando se perfunde hígado de rata en concentraciones fisiológicas de glucosa, la adición de insulina al medio de perfusión incrementa la incorporación de acetato-³H y glucosa-¹⁴C a ácidos grasos totales de hígado. Un resultado análogo ha sido obtenido por Williamson et al. (1966) en la perfusión de hígado de rata sometida a ayuno.

Un mecanismo probablemente importante en el control de la biosíntesis hepática de ácidos grasos "in vivo" es el ejercido por los ácidos grasos libres y glicerol del plasma y sus metabolitos hepáticos. Por otra parte, las investigaciones llevadas a cabo acerca de la influencia de la insulina sobre la lipogénesis hepática (Sweeney y - Ashmore, 1966; Bewsher et al. 1966) sugieren que la insulina puede incrementar de forma rápida la síntesis de ácidos grasos en el hígado - mediante una acción que es primariamente hepática aunque pueda estar potenciada "in vivo" por otros efectos extrahepáticos de la hormona, por ejemplo, su antilipolisis. Esta acción, cuya localización debe - ser ajena a las rutas metabólicas de la glucosa, parece tener lugar a nivel de la propia síntesis de ácidos grasos. En este sentido, son muy significativos los trabajos de Bricker y Levey (1972) y de Allred y - Acehring (1973) que ponen de manifiesto que en hígado de rata la lipogénesis hepática a partir de acetato ~~se~~ inhibe por AMP-cíclico y su dilbutiril derivado, y que esta inhibición tiene lugar a nivel de la - acetil-CoA carboxilasa. Esto sugiere que la activación de la lipogénesis hepática por insulina puede ser mediada por el AMP-cíclico.

El efecto a largo plazo del hiperinsulinismo "in vivo" sobre la lipogénesis hepática en animales normales no diabéticos ha recibido - relativamente poca atención pese a su indudable importancia. Quizá -

donde los efectos de un hiperinsulinismo crónico son mejor observados en relación con la lipogénesis es en los animales con obesidad experimental o hereditaria, siendo el más representativo de ellos el ratón con síndrome obeso-hiperglucémico hereditario; en estos animales el metabolismo lipídico es claramente anormal y estas alteraciones pueden considerarse como secundarias a la excesiva e incontrolada secreción de insulina. En estos animales la síntesis hepática de ácidos grasos a partir de acetato (Winand et al., 1968), citrato (Howard y Lowenstein, 1966) y glucosa (Jansen et al., 1967) está incrementada - varias veces con relación a los animales normales y permanece elevada incluso durante el ayuno. Esta estimulación de la lipogénesis hepática es debida a las elevadas actividades de citrato liasa (Kornacker y Lowenstein, 1964) y acetil-CoA carboxilasa y ácido graso sintetasa - (Chang et al., 1967). También, como es de esperar debido a los elevados niveles de insulina en plasma, la actividad de la glucoquinasa hepática y otras enzimas clave de la glicólisis es también muy superior a la normal (Seidman et al., 1967).

1.7.3 EFECTO SOBRE LA SINTESIS DE TRIGLICERIDOS DE HIGADO Y PLASMA

Se ha citado anteriormente que el efecto antilipolítico de la - insulina debe ser el principal responsable del descenso de los niveles de ácidos grasos libres y glicerol en suero que se produce después de la administración de insulina "in vivo". Aunque algunos autores proponen que esta es la única causa responsable de dicho efecto (West y Passey, 1967), otros investigadores consideran que existe además un efecto adicional debido a que la insulina estimula la captura por el hígado de los ácidos grasos libres del plasma (Penhos et al., 1968).

Como consecuencia de estas acciones extrahepáticas de insulina disminuye la aportación de precursores procedentes del plasma para -

la síntesis hepática de triglicéridos. Si este efecto no es compensado por un incremento en la lipogénesis hepática y en la formación de α -glicerofosfato endógeno, se producirá un descenso en la producción de triglicéridos en el hígado y en su secreción en el plasma en forma de lipoproteínas, aunque la insulina no actúe directamente sobre esta última etapa. Los estudios llevados a cabo en rata (Rubenstein y Rubenstein, 1966) y en humanos (Csorba et al., 1966; Nestel, 1967) sugieren que ninguno de los pasos metabólicos que tienen lugar en la transformación de ácidos grasos libres del plasma en triglicéridos plasmáticos es controlado directamente por insulina, por lo que el descenso de los niveles plasmáticos de ácidos grasos libres provocado por la acción antilipolítica de la insulina provoca un descenso paralelo en la secreción de triglicéridos hepáticos al plasma.

1.8 INFLUENCIA DE LA GESTACION SOBRE EL METABOLISMO DE LIPIDOS

Se sabe que la gestación produce notables cambios en el metabolismo intermediario; hay cantidad de literatura que se refiere a la llamada "influencia diabetogénica" de la gestación y "prediabetes de embarazo" (Lind et al., 1973), y sobre otros problemas complejos tanto fisiológicos como clínicos.

Con pocas excepciones, las investigaciones de esta naturaleza se han venido realizando, fundamentalmente, sobre el metabolismo de hidratos de carbono; sin embargo, según los estudios que se están realizando en los últimos años, es presumible que muchas de las citadas alteraciones tengan lugar en el metabolismo lipídico.

1.8.1 MODIFICACIONES CUANTITATIVAS DE LOS LIPIDOS PLASMATICOS

Se han realizado estudios de este tipo con gran profusión en -

humanos, desde el primer trimestre de gestación hasta varios días después del parto; analizando los resultados estadísticamente, se han puesto de manifiesto los siguientes hechos: (Mullick et al., 1964; Cavalli, 1966; Fairweather, 1971; Fabian et al., 1968; Dannenburg et al., 1965; Vikrot, 1964):

- Una hiperlipemia, que comenzando en el primer trimestre se incrementa progresivamente y se mantiene hasta 6 días después del parto.
- Un incremento en el nivel de ácidos grasos totales, que comienza en el segundo trimestre y llega a su elevación máxima en los tres últimos meses de gestación, para descender después de 4 días de estado puerperal.
- Una hipercolesterolemia (con igual incremento de colesterol libre y esterificado) que manifestándose ya en el primer trimestre, alcanza el máximo al final de la gestación, manteniéndose el nivel en los primeros días del puerperio.
- Un incremento del nivel de cuerpos cetónicos (acetona, acetoacético, β - hidroxibutírico), que comienza a ser significativo durante los primeros 6 meses, alcanza un máximo en el tercer trimestre y disminuye rápidamente en los primeros días de estado puerperal.
- Un progresivo incremento de fosfolípidos que comienza en el primer trimestre, sin que tenga lugar una disminución significativa durante los 6 días siguientes al parto. Referente a las clases de fosfolípidos, aumenta, notablemente, la fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina a expensas de fosfatidilserina y fosfatidilinositol.
- Incremento de las β - lipoproteínas, desde el segundo trimestre alcanzándose el máximo en los tres últimos meses; disminuye el

nivel durante los 3 días siguientes al parto.

Interpretando estos hechos a la luz de los conocimientos actuales, se puede concluir que durante la gestación se moviliza una gran cantidad de lípidos. El aumento de ácidos grasos no esterificados, - glicéridos, fosfolípidos y β - lipoproteínas en plasma, apoya la hipótesis de la existencia de una "hiperlipemia de transporte", inducida por un aumento de lipólisis en el tejido adiposo. Esta interpretación también parece válida para explicar la hipercolesterolemia e hipercetonemia, ya que elevados niveles de ácidos grasos no esterificados en plasma incrementan la oxidación periférica de los ácidos grasos y, - por tanto, la formación de acetil-CoA. Considerando que este metabolito es un precursor del colesterol y de los cuerpos cetónicos, y que - su entrada en el ciclo de Krebs está reducida durante la gestación - (debido a la baja utilización de glucosa), se comprende que elevados niveles de ácidos grasos libres conduzcan a la biosíntesis de ambos - metabolitos.

Si bien estos fenómenos de hiperlipemia plasmática gestacional tienen lugar en la mayoría de las especies ocurre exactamente lo contrario en el caso del conejo y del cobaya (Popják, 1946), ambas especies desarrollan una profunda hipolipemia, referente a casi todas las clases de lípidos plasmáticos, hacia el final de la gestación. Esta - enorme disminución en el contenido de lípidos plasmáticos fue atribuída por Baumann y Holly (1925-26) a una utilización rápida de los lípidos maternos por el feto, durante el período de su máximo crecimiento; sin embargo, el grado de hipolipemia es independiente del número de fetos que contiene la madre, por lo que la anterior hipótesis no resulta satisfactoria. Probablemente deba de ser atribuída a determinadas influencias hormonales que se desarrollan durante la gestación (Popják, 1954).

En mono rhesus se presenta una hipolipemia, con un aumento de - ácidos grasos y triglicéridos, sólo al final de la gestación (Roux et al., 1974).

1.8.2 INFLUENCIAS HORMONALES

Con vistas a dilucidar los mecanismos que, durante la gestación, conducen a la aparición de una hiperlipemia de transporte así como al considerable incremento de la lipólisis, se estudiaron las modificaciones de los niveles de glucosa y ácidos grasos libres de plasma después de la administración de glucosa, insulina, glucosa más insulina, fructosa, fructosa 1-6P, adrenalina y noradrenalina, a mujeres gestantes a partir del tercer trimestre de gestación, así como a mujeres control - (Froesch et al., 1962; Froesch, 1966; Ginsberg, 1966; Lind et al., - 1973).

De estos estudios se deduce que, en condiciones de disponibilidad de glucosa, la lipólisis disminuye menos en mujeres gestantes que en controles, observándose además que este efecto no es debido a una - reducción en la utilización de glucosa por las células adiposas, sino mas bien a una hipersensibilidad de las lipasas del tejido adiposo a - conocidos agentes lipolíticos (catecolaminas).

Por otra parte, además de los cambios observados en el metabolismo lipídico se producen alteraciones en el metabolismo de la glucosa - que consisten, principalmente, en una disminución de la tolerancia por la hexosa y en una resistencia a los efectos de la insulina (Bleicher, 1964; Benjamín, 1966; Velasco, 1966; Lind, 1973). Los estudios realizados por Knopp y Col., (1973) en tejido adiposo de rata gestante, ponen de manifiesto que la hiperfagia e hiperinsulinismo maternos son característicos de la segunda mitad de la gestación; dentro de este periodo se han identificado dos fases metabólicas distintas: inicialmente, la

acumulación de grasa se ve aumentada por conversión de glucosa a ácidos grasos de triglicéridos y una disminución de la liberación de ácidos grasos, ya que las necesidades fetales y placentales son mínimas en este periodo; posteriormente, y hasta el final de la gestación, se deteriora progresivamente la efectividad de la insulina materna, reduciéndose de forma considerable la síntesis de ácidos grasos de triglicéridos a partir de glucosa y movilizándose los depósitos de grasa materna de forma creciente como ácidos grasos libres. Estos hechos están estrechamente sincronizados con el crecimiento de la unidad feto-placental e indican que la acumulación de grasa materna, hacia la mitad de la gestación, resulta del incremento de la toma de alimento y de la insulina del plasma; sin embargo, pese a la continua hiperfagia e hiperinsulinismo hasta el final de la gestación, el depósito de grasa materno disminuye como consecuencia de un descenso en la respuesta del tejido adiposo a la insulina; este mecanismo puede considerarse como una adaptación para el crecimiento fetal, de modo que la glucosa ingerida es derivada hacia la circulación fetal; al mismo tiempo, los lípidos almacenados previamente son movilizados para proporcionar a la madre una fuente de energía en sustitución de la glucosa.

Con respecto a las influencias durante la gestación de conocidos agentes lipolíticos, la mayoría de los autores admiten la existencia de una hipersecreción de STH (Gemzell et al., 1955; Laron et al., 1967) y del tiroides (Barnes, 1966), así como un incremento significativo de cortisona (Martin et al., 1968; Bro-Rasmussen et al., 1962; Fairweather, 1971). Las determinaciones individuales de cortisol en plasma demostraron que la corteza adrenal segrega una gran cantidad de hidrocortisona y que el cortisol libre alcanza niveles más elevados que en estado normal (Doe et al., 1960; Gautray, 1968; Fairweather, 1971).

Referente a los niveles de catecolaminas en plasma no hay acuerdo en la literatura, son normales para algunos autores, (Israel et al. 1959), y se elevan según otros (Leone et al., 1958).

Por otra parte, Spoto, (1962) aduce que no existen pruebas consistentes de que, a lo largo de la gestación, se produzca una hiperactividad del sistema nervioso simpático. No obstante, parece que la gestación modifica de diferentes formas, el equilibrio neuro-vegetativo de varios órganos, por lo que no se puede excluir la posibilidad de un hipertono simpático en torno al tejido adiposo, que conduciría, como se sabe a una estimulación de los glicéridos.

Se puede concluir por tanto que a parte de los factores intrínsecos de la célula adiposa, la lipólisis se puede explicar mediante las modificaciones del sistema endocrino que tienen lugar durante la gestación.

Por último, no hay que olvidar la gran influencia de la placenta en las modificaciones del metabolismo lipídico, Josimovich (1962) y Kaplan (1964), aislaron de dicho órgano una hormona-somatotropina coriónica- que alcanza su máximo de concentración durante los tres últimos meses de la gestación humana. Esta hormona, similar a la hormona del crecimiento, contribuye a potenciar los efectos lipolíticos y antiinsulínicos de la gestación. Knopp et al (1973), en sus experiencias, mencionadas más arriba, sobre tejido adiposo de rata gestante, ponen de manifiesto que, durante la segunda parte de la gestación se libera esta hormona placentaria, provocándose una acción antagónica a la insulina, que trae como consecuencia un aumento en la movilización de ácidos grasos libres así como una disminución en el consumo de glucosa que es, a su vez, utilizada por el feto.

En tal situación endocrina, la actividad funcional de los islo-

tes de Langerhans no puede dejar de verse afectada; de hecho Quinto y col. (1964) observaron una actividad basal más elevada, una hiperplasia e hipertrofia de los islotes con el consiguiente aumento de insulina en el plasma. Otros autores (Lind et al., 1973; Picard, 1967; Freinkel, 1964) concluyeron que, después de una administración de glucosa, el nivel de insulina se eleva más en mujeres gestantes que en normales y que existe, a su vez, un consumo mucho más rápido de la hormona, relacionado con una degradación de ella, por las enzimas proteolíticas, sobre todo de la placenta ("insulinasa").

Todas las modificaciones metabólicas de la gestación podrían explicarse aceptando la teoría de Randle sobre la función del ciclo "glucosa-ácidos grasos" (Randle et al., 1965, 1966). De acuerdo con esta teoría, bien basada en hechos experimentales, el equilibrio entre estas dos sustancias energéticas sería el resultado de un mecanismo de autoregulación mediante el cual, mientras que por un lado la utilización de glucosa inhibe la lipólisis y la oxidación de ácidos grasos libres en el músculo, por otro, la movilización y utilización periférica de ácidos grasos, reduce el metabolismo de la glucosa a nivel de dicho tejido y, al menos en estados diabéticos, también a nivel de la célula adiposa.

Aunque este ciclo podría asegurar la homeostasis sin intervención del sistema endocrino, es evidente que algunas hormonas pueden afectar su función. La insulina reduce la lipólisis en tejido adiposo y músculo, aumentando la esterificación de los ácidos grasos, mientras que las hormonas antiinsulínicas estimulan la lipólisis. De acuerdo con Randle, el efecto inhibitorio de estas hormonas sobre la utilización periférica de glucosa no sería un fenómeno debido a una interferencia con los sistemas enzimáticos musculares implicados, sino a una simple consecuencia de sus propiedades "lipomovilizantes"; de esta forma las relaciones entre las modificaciones de los metabolismos de

glucosa y lípidos durante la gestación, deberán interpretarse de diferente manera. En efecto, los cambios en el metabolismo de la glucosa estarán subordinados a los del lipídico, como se pone de manifiesto - por los siguientes hechos: aumento de hormonas lipolíticas, incremento de la sensibilidad de las lipasas a catecolaminas, aparición de un factor lipolítico placentario con el consiguiente incremento de la movilización de ácidos grasos libres y concentración de los mismos en plasma, que interfiere con la utilización periférica de glucosa, determinando una resistencia a los efectos glicolíticos de la insulina que traería como consecuencia la aparición de un hiperinsulinismo secundario.

1.8.3 BIOSINTESIS DE LIPIDOS

El elevado nivel de lipólisis durante la gestación, puede parecer contradictorio con el hecho de que normalmente se incrementan las reservas de grasa durante dicho estado, no solamente en casos de exceso de dieta sino en casos de una dieta normal. Es necesario admitir - entonces, que durante la gestación las células adiposas sintetizan - ácidos grasos en mayor proporción que en estado normal.

Este fenómeno sólo puede ser explicado parcialmente por el hiperinsulinismo gestacional, ya que la insulina ejerce, al mismo tiempo, efectos lipogénicos y antilipolíticos. El problema consiste, entonces, en clasificar los mecanismos a través de los cuales, en presencia de altos niveles de insulina, el tejido adiposo de una mujer gestante incrementa su actividad lipogénica sin una disminución de la lipólisis. Se sabe que las células adiposas utilizan la glucosa mediante la ruta de Embden-Meyerhof y la ruta de las pentosas; ambas vías metabólicas conducen a la formación de dos triosas-P: gliceraldehído-P y dihidroxiacetona-P. Existe entre ambas un equilibrio que depende de

la actividad de la triosa-P-isomerasa y de las velocidades de las - reacciones siguientes a cada una de ellas. La contribución de ambas rutas en la utilización de glucosa se estudia incubando células adiposas con glucosa marcada radiactivamente en posiciones 1 y 6 respectivamente, habiéndose llegado a los siguientes resultados (Martín et al., 1965; Katz et al., 1966).

- En tejido adiposo de una mujer gestante predomina el ciclo de las pentosas sobre la ruta de Embden-Meyerhof.
- En sentido absoluto, el tejido adiposo sintetiza, a partir de ambos precursores, cantidades de ácidos grasos y glicerol superiores a los normales.
- Con respecto a mujeres control, la cantidad de glucosa metabolizada vía pentosas es mayor en las mujeres gestantes, si se calcula sobre la base de síntesis de glicerol.
- La conversión de gliceraldehído-P a dihidroxiacetona-P es mucho menor que en estado normal, en las células adiposas.

Estos hechos ponen de manifiesto que existe un aumento de la lipogénesis durante la gestación; las células adiposas sintetizan más ácidos grasos y menos glicerol a partir de glucosa, explicando, razonablemente bien el mecanismo mediante el cual el tejido adiposo de una mujer gestante puede, al mismo tiempo, incrementar sus actividades lipolíticas y lipogénicas. En efecto, si las cantidades mayores de glucosa que se utilizan por el tejido adiposo (bajo el estímulo de la insulina) se transforma en ácidos grasos mas que en glicerol, es lógico que junto a un incremento de la lipogénesis hay una falta relativa de α -glicero-P, responsable de una mayor movilización de ácidos grasos, y el alto contenido en glicéridos de la célula adiposa podría explicar la hipersensibilidad de las lipasas a las catecolaminas.

El hígado juega un papel muy importante en el metabolismo intermedio, experimentando una serie de alteraciones durante la gestación : (Dannenburg et al., 1964)

- La lipogénesis hepática, a partir de acetato, es superior en estado gestante que en normal.
- Cuando se utilizan pirúvico y glucosa como precursores, la actividad liposintética es igual en estado normal y gestante.
- No hay diferencias cualitativas en la utilización hepática de glucosa, que se puede detectar comparando radiactividades incorporadas en glicerol y en ácidos grasos.

Estos resultados, si bien son ciertos para la mayoría de las especies estudiadas, resultan contradictorios cuando se estudia la lipogénesis en tejidos de conejo o cobaya gestantes (Popják, 1954; Roux, 1966). El estudio sobre la utilización de acetato por cortes de hígado de conejos gestantes y no gestantes proporciona una explicación para la hipolipemia gestacional; los cortes de hígado de coneja gestante utilizaron mucho menos acetato que las no gestantes; la lipogénesis reprimida en el hígado es atribuible a alguna influencia hormonal. Asimismo, Popják y Beckmans (1950) encontraron que la velocidad de síntesis de colesterol es inferior en conejas gestantes.

1.9 ESTUDIOS SOBRE LAS RELACIONES HORMONALES ENTRE MADRE Y FETO

El estudio de las posibles relaciones materno-fetales tiene una singular importancia ya que, determinados desórdenes endocrinos de la madre pueden producir daños irreversibles al feto. Que, por otra parte, podrían ser evitados si se conociesen estas interacciones.

Además de los sistemas endocrinos maternos y fetales el otro elemento esencial es la placenta, que no sólo regula el cambio de sustancias entre los dos organismos sino que es un centro esencial en la producción de hormonas (gonadotropina coriónica, somatotropina, estrógenos).

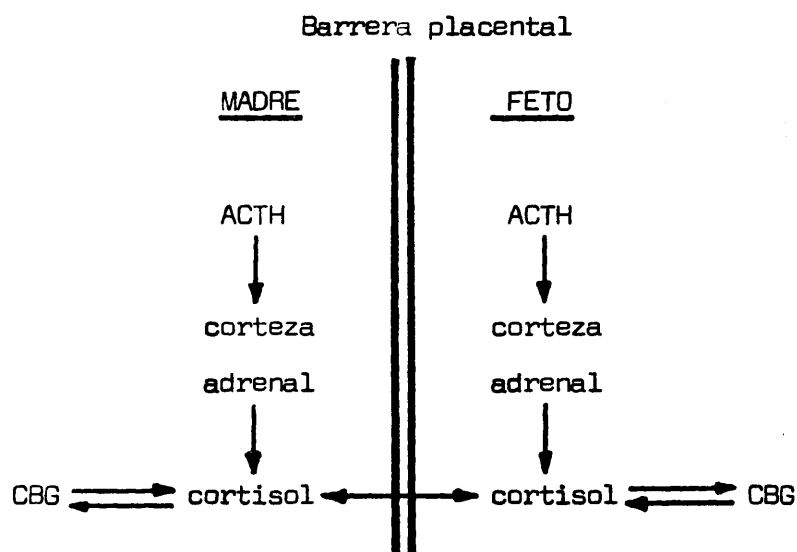
Con respecto a la insulina parece existir acuerdo en que el feto sintetiza su propia hormona, poseyendo autonomía respecto a su producción y eliminación, ya desde las primeras etapas de la vida intrauterina (Alexander et al., 1968a; Basset, 1971); sin embargo, no todos los autores están de acuerdo en lo que se refiere a sus mecanismos de secreción en respuesta a conocidos estimulantes como la glucosa; no obstante, parece ser que la madurez del feto a este respecto se desarrolla en la última parte de la gestación y, en algunos casos, después del nacimiento (Willes et al., 1968; Alexander et al. 1968b). En cualquier caso, la placenta parece ser impermeable a la insulina (Spellacy et al., 1964; Adam et al., 1968) al menos en hombre y en oveja, como lo demuestra la independencia de concentraciones en las circulaciones materna y fetal y la ausencia de una transferencia neta en preparaciones de placenta perfundida.

La placenta no produce ninguna hormona tiroidea, ni forma parte de este sistema endocrino; su única misión a este respecto es regular el paso entre madre y feto. La hormona estimulante del tiroides (TSH) no atraviesa, aparentemente, la placenta y la actividad del tiroide fetal depende de la elaboración de TSH por la propia pituitaria (Peterson et al., 1952). El conocido efecto "Feed-back", homeostático, de la tiroxina en la producción de TSH también se observa en el feto. Se concluye, por tanto, que el tiroides fetal desarrolla capacidad para la completa producción de hormonas desde el principio de la gestación; esto incluye: captura de yoduro, transfor

mación a iodo, iodación de la tirosina y producción de triiodo tironina y tiroxina. Ambas atraviesan la placenta, si bien el paso es lento para esta última.

En contraste con el tiroides, la glándula adrenal del feto es - anatómicamente diferente de la del adulto y produce un conjunto de - hormonas diferente desde el punto de vista cuantitativo. A partir de estudios "in vivo" e "in vitro" se deduce que la glándula fetal produce cortisol (Lamman, 1961; Murphy et al., 1974). En la primera parte de la gestación humana, la mayor parte del cortisol atraviesa la placenta, para transformarse en el feto en cortisona. Parece probable que la mayor parte de cortisona de suero materno, derive de la unidad feto-placentar. En otras especies como en la oveja, la placenta supone una barrera significativa en el movimiento materno-fetal de cortisol. En rata, la actividad adrenocorticotrópica se inicia en los días 17 y 18 del desarrollo intrauterino (Milkovic et al., 1973; Milkovic et al., 1970).

Por otra parte, la ACTH materna no atraviesa la placenta y el - desarrollo y función de la corteza adrenal del feto depende de la estimulación por su propia ACTH que elabora la pituitaria. El cortisol es enlazado por proteínas de suero, la más importante de las cuales es - una globulina específica (transcortina). Durante la gestación la capacidad de suero materno para enlazar cortisol se eleva y es mayor que - el feto (Sandberg et al., 1965); esto puede favorecer elevadas concentraciones de cortisol en sangre materna y limitar su transferencia vía placenta (figura 3).



CBG = cortisol binding globulin-globulina enlazante de cortisol

Figura 3. Relaciones materno fetales adrenocorticotropicas en la producción de cortisol.

Con respecto a las hormonas sexuales, las relaciones materno - fetales son mucho más complejas; en este sentido, además del control en la distribución entre ambas circulaciones la placenta es muy activa en la producción de estas hormonas. Parece existir una interdependencía entre placenta y feto, ya que cada uno proporciona al otro - precursores para la síntesis de esteroides (Bengtsson et al., 1964; Lyons et al., 1968; Klevit, 1966; Aarskog, 1969; Rivarola et al., - 1968; Pearlman et al., 1967).

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 MATERIAL BIOLOGICO

Toda la experimentación se ha llevado a cabo con conejas hembras, de raza neozelandesa blanca (3,0-3,5 Kg. de peso y 4-6 meses de edad), mantenidos en jaulas independientes, en una habitación debidamente acondicionada a 22-26°C. de temperatura. La alimentación se realizó siempre con un pienso común para conejos (UFAC, tipo L.30) y el agua fué administrada a discreción.

Los estudios se han realizado en 4 series diferentes de animales: control, no gestante tratado con insulina, gestante normal y gestante tratado con insulina. La edad de gestación ha sido siempre exactamente conocida. Las experiencias se han realizado a lo largo del periodo de gestación, hasta el día 29 de la misma, en que los animales son sacrificados (el alumbramiento se produce en los días 0-31 de gestación).

Las figuras dadas como representación gráfica de los resultados son siempre el valor medio obtenido de cuatro animales sometidos a idéntico tratamiento.

2.2 ADMINISTRACION DE INSULINA

Se utilizó insulina cristalina, libre de glucagón (Nordisk Insulinlaboratorium, Copenhagen, 28,5U/mg. de material anhidro).

La administración a los animales tratados se realiza por vía subcutánea, inyectando una dosis de 1,0U disuelta en agua estéril/día/animal, a partir del séptimo día correspondiente al comienzo de la gestación y a lo largo de todo el periodo de la misma. La administración a los animales no gestantes se hace coincidir con los mismos

días ya que las experiencias se llevan a cabo simultáneamente en todos los tipos diferentes de animales.

2.3 EXTRACCION DE LIPIDOS TOTALES DE TEJIDOS

Todos los animales se sacrifican el día correspondiente al día 29 de gestación de los gestantes, mediante una inyección de aire en la vena periférica de la oreja; la muerte se produce inmediatamente en pocos segundos. Los órganos maternos (pulmón, hígado, y tejido adiposo) son extraídos inmediatamente, lavados en una disolución de NaCl al 0,85% fría, e introducidos en aire líquido hasta su utilización posterior. En el caso de los animales gestantes, los fetos son obtenidos por cesárea y sacrificados simultáneamente por decapitación; los órganos fetales (pulmón e hígado) son extraídos rápidamente, lavados con NaCl 0,85% frío, e igualmente, introducidos en aire líquido.

Para la extracción de los lípidos totales, los tejidos congelados son expuestos a temperatura ambiente, hasta que se obtiene la consistencia normal. Posteriormente, los tejidos, debidamente troceados se homogeneizan en un Omni-Mixer (Sorvall), con cloroformo/metanol(2:1, v/v) (20 ml de cloroformo/metanol/gr. de tejido), de acuerdo con el método de Folch, (1951). La suspensión clorofórmica se lava con una solución de KCl 0,1M (0,25 ml/ml suspensión clorofórmica) se agita y se centrifuga 5 minutos a 5.000 r.p.m., la fase inferior clorofórmica se extrae y deja secar sobre Na_2SO_4 anhidro, durante unas horas, una vez seca se separa del Na_2SO_4 por filtración y se evapora a sequedad en un evaporador rotatorio a baja presión.

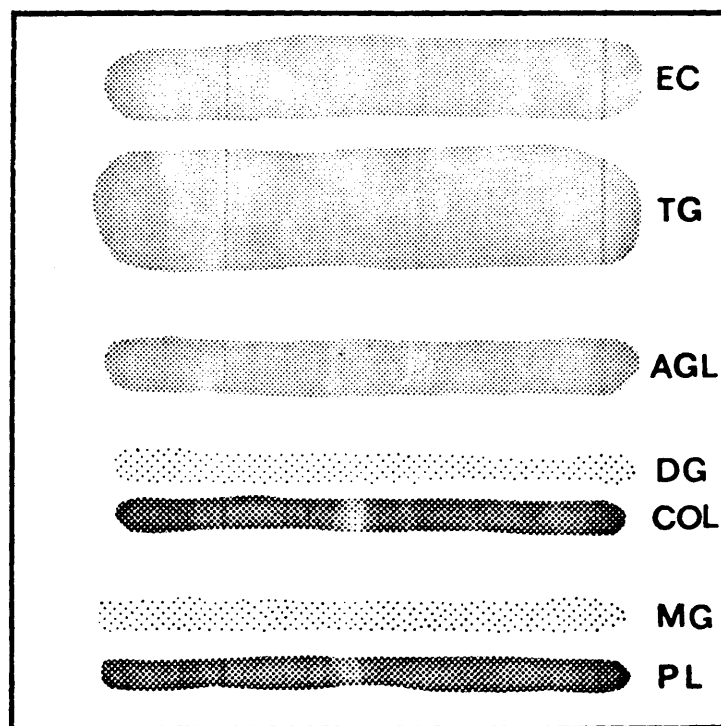
Durante todo el proceso de extracción, la fase clorofórmica se gasea constantemente con N_2 a fin de evitar la posible oxidación de los lípidos. En algunas ocasiones se utilizó un antioxidante, BHT, -

que es añadido al comienzo de la extracción, si bien no es muy aconsejable su utilización por producir interferencias en el análisis posterior de los lípidos por cromatografía de gases, si no se toman las correspondientes medidas de purificación.

2.3.1 SEPARACION CROMATOGRAFICA DE LOS LIPIDOS TOTALES DE TEJIDOS

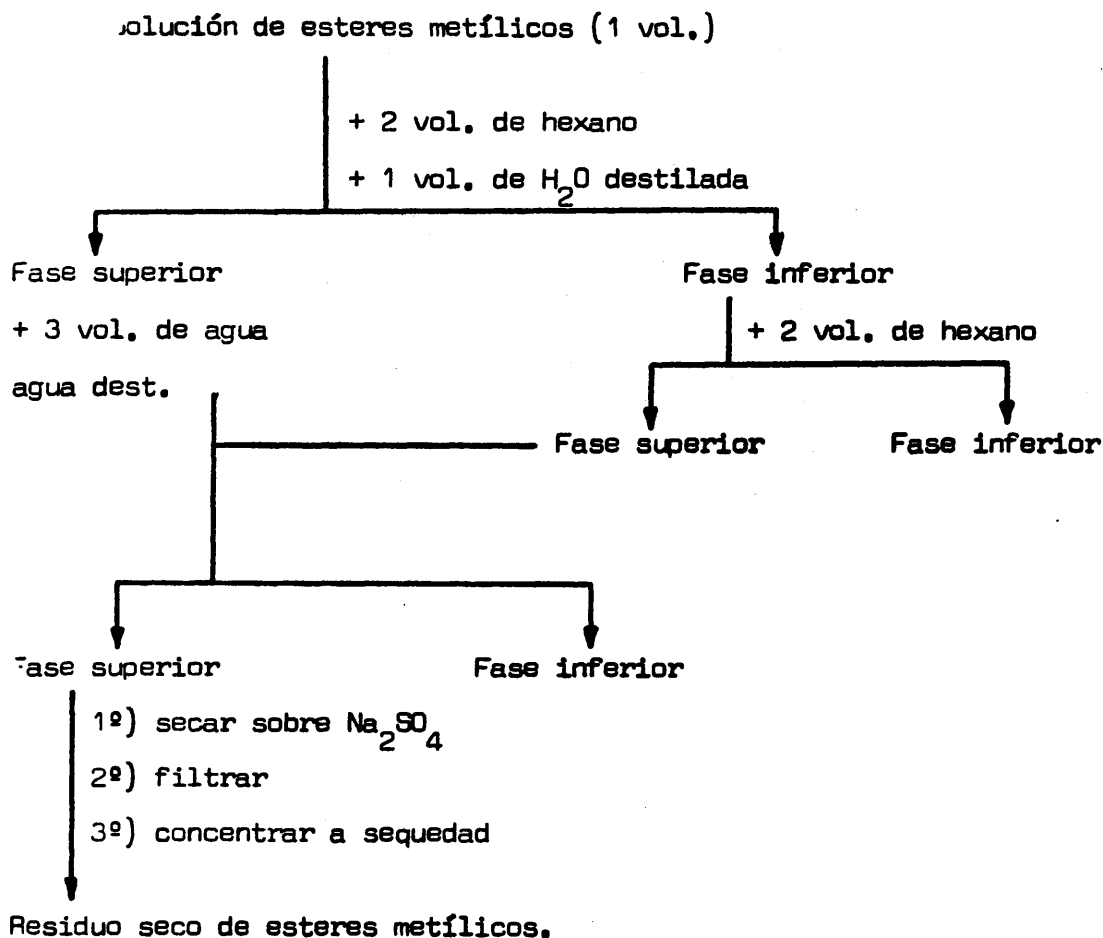
La separación de las diferentes clases lipídicas se lleva a cabo por cromatografía en capa fina, sobre placas de Silicagel G (20 x 20 cm.), de 600 μ de espesor, el residuo seco de lípidos totales se disuelve en cloroformo/metanol (2:1, V/V) y se aplican sobre las placas en banda continua (16 cm.; 20 mg. de lípidos totales) y se desarrollan en n-hexano/éter/acético (70: 30:1, V/V). Las bandas correspondientes a triglicéridos y fosfolípidos se detectan pulverizando las placas, una vez secas de disolvente, con Rodamina 6G (0,1% en metanol) (Mangold et al., 1961) los lípidos aparecen como manchas rosas sobre fondo naranja. Bajo la luz ultravioleta se destaca más el contraste entre la mancha y el fondo: no destruye los lípidos y por esta razón es el revelador utilizado siempre que se proceda a un análisis de ácidos grasos.

Según este tipo de cromatografía, el conjunto de los fosfolípidos permanecen en el origen (PL) separándose, por el contrario, las restantes especies lipídicas menos polares, entre sí. De esta forma se obtienen, perfectamente diferenciados, los monoglicéridos (MG), - colesterol (COL), diglicéridos (DG), ácidos grasos libres (AGL), triglicéridos (TG) y esteres de colesterol(EC), de acuerdo con su polaridad:



2.4 ANALISIS DE ACIDOS GRASOS TOTALES Y DE TRIGLICERIDOS Y FOSFOLIPIDOS DE TEJIDOS. OBTENCION DE ESTERES METILICOS Y ANALISIS

Un extracto de lípidos totales, así como las bandas correspondientes a triglicéridos y fosfolípidos que se rasparon, se metanolizaron de acuerdo con el método de Metcalfe y col. (1961): los lípidos se sitúan en tubos de vidrio (ya sean puros o adsorbidos sobre Silicagel), de paredes gruesas de 20 x 150 mm. y se agregan: 1 ml. de metanol reactivo (C. Erba), 1 ml. de trifluoruro de boro-metanol al 14% y 0,9 ml. de benceno, por cada 10 mg. de lípidos. Los tubos se cierran con soplete, bajo atmósfera de nitrógeno y la mezcla se mantiene a 110°C, durante una hora y 30 minutos. Transcurrido este tiempo, los tubos se enfrían a temperatura ambiente y se abren. La extracción de esteres metílicos se realiza de acuerdo con el siguiente esquema:



De esta forma se obtienen los esteres metílicos de los ácidos grasos del conjunto de los lípidos totales o de cualquier fracción lipídica.

Las muestras de esteres metílicos se purifican por cromatografía en capa fina (es absolutamente necesaria la purificación cuando se ha utilizado BHT como antioxidante en la extracción de lípidos), sobre placas de Silicagel G, 20 x 10 cm. y 500 μ de espesor que se desarrollan en el sistema n-hexano-éter (98,5:1,5 V/V). Las bandas se localizan por pulverización de las placas con Rodamina 6G al 0,1% en metanol y examen bajo luz ultravioleta. La banda correspondiente a los esteres metílicos que aparece justo encima del origen, se raspa y transfiere a un tubo y se extrae con n-hexano siguiendo el esquema de extracción de esteres metílicos.

El análisis de los mismos (disueltos en un pequeño volumen de hexano) se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard modelo 5750, equipado con un detector de ionización de llama y columnas de acero inoxidable, de 6 pies de longitud y 0,25 mm. de diámetro interno rellenas de polisuccinato al 20% sobre Cromosorb (80-100 mesh). Se operó a 180°C, siendo las temperaturas del detector e inyector de 250 y 350°C, respectivamente.

Las áreas de los picos se determinaron con un integrador-impresor Hewlett-Packard, modelo 3370 A.

La identidad de los picos y validez cuantitativa de las concentraciones calculadas para los ácidos grasos, se establecen por comparación con patrones de esteres metílicos de los diferentes ácidos grasos.

Las figuras analíticas dadas en la representación gráfica de los resultados, son el valor medio de tres muestras iguales ($p < 0,01$). El grado de insaturación se calcula como (% de monoinsaturados/100) + 2 (% de diinsaturados/100) + 3 (% de triinsaturados/100) + (% de tetrainsaturados/100).

2.5 HIDROLISIS ENZIMATICA DE FOSFOLIPIDOS PARA ESTUDIAR LA DISTRIBUCION POSICIONAL DE ACIDOS GRASOS

Con el fin de estudiar la distribución posicional de ácidos grasos en fosfatidilcolinas y fosfatidiletanolaminas de tejidos, fueron aisladas de los lípidos totales por cromatografía en capa fina, sobre placas de 20 x 40 cm. y 1 mm. de espesor (90 gr. de Silicagel G/ 160 ml. de agua destilada, para realizar la extensión de dos placas de estas dimensiones). Conviene activar las placas durante una hora a 110°C antes de su utilización.

Sobre cada una de ellas se aplican 100 mg. de lípidos totales, en forma de banda continua, y se desarrollan en el sistema cloroformo/metanol/agua (65:25:4, V/V/V). Las bandas de lípidos se localizan revelando dos franjas estrechas a ambos lados de la placa con solución Dittmer, que es un revelador específico de fosfolípidos (Dittmer 1964).

Se recogen las bandas correspondientes a fosfatidilcolina y - fosfatidiletanolamina y se eluyen del ácido silícico con sucesivas - proporciones de cloroformo/metanol (2:1, 1:1, 1:9, V/V) y metanol ab soluto. Los extractos reunidos se evaporan a sequedad para ser sometidos a hidrólisis con fosfolipasa A₂, que libera específicamente los ácidos grasos de la posición 2 del fosfolípido original.

La hidrólisis se llevó a cabo por el método de Van Golde y col. (1966): se añade el fosfolípido (10 mg. exentos de ácido silícico) a una mezcla de veneno de *Crotalus Adamanteus* (Sigma) (4 mg.), cloruro cálcico 5 mM (0,4 ml.) y tampón borato 0,1 M pH 7,2 (0,4 ml). El con junto de la mezcla se agita en una incubadora durante dos horas a 23°C. El curso de la hidrólisis se siguió utilizando cloroformo/meta nol/agua (65:25:4, V/V/V) como sistema de desarrollo; la hidrólisis es total a las dos horas y se detiene la reacción adicionando 5 ml. de metanol a la mezcla, después de lo cual se evapora a sequedad en evaporador rotatorio. Los ácidos grasos liberados y lisoderivados de ambos fosfolípidos se disuelven en cloroformo/metanol (1:1, V/V) y - se separan en placas de Silicagel G, de 20 x 20 cm. y 500 μ de espesor, que se desarrollan en cloroformo/metanol/agua (65:25:4, V/V/V).

Las bandas de lisoderivados y de ácidos grasos libres (posi- ción 1 y 2, respectivamente) se localizan pulverizando las placas - con Rodamina 6G (0,1% en metanol) y examen con luz ultravioleta. Se recogen las bandas correspondientes y se metanolizan y analizan se—

gún el método descrito en el apartado 2.4 .

Hay que hacer resaltar que, con el material utilizado por nosotros, las PE de pulmón no se hidrolizan totalmente con veneno de *Crotalus*, al menos en las dos horas de incubación, y por esta razón se utilizaron indistintamente para su hidrólisis, venenos de *Naja-Naja* o de *Naja-Haje* (ambos de Sigma), que conducen a la hidrólisis total del fosfolípido mencionado, a las dos horas de incubación.

2.6 HIDROLISIS DE TRIGLICERIDOS CON LIPASA PANCREATICA PARA ESTUDIAR LA DISTRIBUCION PARCIAL DE ACIDOS GRASOS

Los lípidos extraídos de acuerdo con lo descrito en el apartado 2.3 se separan por cromatografía en capa fina, sobre placas de Silicagel G de 20 x 40 cm. y 1.000 μ de espesor. Se aplican sobre la placa 100 mg. de lípidos totales en forma de banda continua y se desarrollan en n-hexano/éter/acético (70:30:1 V/V/V). La banda de triglicéridos se localizó mediante pulverización de las placas con Rodamina 6G (0,1% metanol) y observación bajo luz ultravioleta. La banda correspondiente a dichas especies lipídicas se raspa de la placa y se transfiere a tubos de vidrio (boca esmerilada, B-29), procediéndose a continuación a la elución del ácido silícico, por sucesivas extracciones con cloroformo puro. Las fases clorofórmicas reunidas se evaporan a sequedad.

La hidrólisis de los triglicéridos, que permite estudiar la distribución parcial de ácidos grasos, se llevó a cabo de la siguiente manera: a 10 mg. de triglicéridos puros se añaden 0,25 ml. de solución de CaCl_2 al 22% (p/v), 0,35 ml. de desoxicolato sódico al 0,1% (p/v) y 4,0 ml. de tampón tris 1 M, pH 8,0. Esta mezcla previamente sonicada, se incuba con lipasa pancreática (19 mg. previamente

lavados con acetona fría), a 40°C, durante 10 minutos. La reacción se detiene por adición de HCl 6N (0,7 ml), y los productos de hidrólisis se obtienen mediante tres extracciones sucesivas con 20 ml. de éter. Las fases etéreas reunidas se secan sobre Na_2SO_4 anhidrido; a continuación se filtra y evapora a sequedad en evaporador rotatorio.

Los productos de hidrólisis se separan por cromatografía en capa fina, sobre placas de Silicagel G de 500 μ de espesor y de 20 x 20 cm.; el sistema de disolventes empleado es n-hexano/éter/acético (70:30:1, V/V/V). La detección de los ácidos grasos libres (posiciones 1 + 3) y monoglicéridos (posición 2) se realiza por pulverización de las placas con Rodamina 6G (0,1% en metanol) y observación bajo luz ultravioleta. Las bandas correspondientes a mencionadas posiciones son transferidas a tubos de metanolisis, procediéndose al análisis de los esteres metílicos correspondientes, según la metodología descrita en el apartado 2.3 .

2.7 BIOSINTESIS DE FOSFOLIPIDOS A PARTIR DE PRECURSORES RADIOACTIVOS

Para estas experiencias se utilizaron conejas gestantes de 21 y 28 días de gestación, gazapos recién nacidos extraídos por cesárea a los 31 días de gestación y habiendo respirado una hora, gazapos de 5 días de edad y conejas no gestantes como control.

Se estudió la incorporación de (U - ^{14}C)-L- α -glicerofosfato y -ácido (9,10- ^3H)-palmitico (Amersham. The Radiochemical Centre) en homogeneizados totales y fracción microsomal de hígado y pulmón de madres, fetos, gazapos y control.

2.7.1 PREPARACION DE HOMOGENEIZADOS

Los animales son sacrificados como ya se ha descrito anteriormente y los órganos extraídos se sumergen inmediatamente en tampón fosfato 0,1 M ($\text{PO}_4\text{H}_2\text{K/KOH/EDTA-MgK}$ 0,001 M; pH 7,4) frío ($4-5^\circ$) en el cual se trocean y lavan varias veces para eliminar restos de sangre.

La homogeneización se lleva a cabo en un homogeneizador tipo Potter-Elvehjem de émbolo de teflón utilizando tampón fosfato 0,1 M en la proporción 4 ml. tampón/gr. de tejido. Del homogeneizado se separan alícuotas para la incubación de homogeneizado total y análisis de proteínas y el resto se utiliza para aislamiento de fracción microsomal.

En todas las experiencias se hicieron "pools" comunes con todas las madres y fetos de la misma edad.

2.7.2 AISLAMIENTO DE FRACCION MICROSOMAL

El homogeneizado total se somete a tres centrifugaciones sucesivas de 10 min. de duración a 8.000g en una centrífuga refrigerada - Sorvall tipo RC2B, despreciando en cada una de ellas el sedimento y volviendo a centrifugar el sobrenadante. Durante todo el proceso la temperatura se mantuvo entre 2 y 3°C .

El sobrenadante de la tercera centrifugación se sometió a una última centrifugación a 90.000g durante 1 hr. en una ultracentrífuga Beckmann tipo L-4 manteniendo la temperatura constante entre $2-3^\circ\text{C}$. El sobrenadante se decanta y el sedimento se lava una vez con tampón fosfato, después de lo cual se resuspende utilizando un Potter de vi

drio esmerilado hasta obtener un homogeneizado con una concentración de proteína de 4 mg/ml aproximadamente. Se separa una alícuota para análisis de proteína y el resto se utiliza en las incubaciones de - fracción microsomal.

2.7.3 PREPARACION DEL MEDIO DE INCUBACION

El medio de incubación se preparó siguiendo el método descrito por Tombropoulos (1973).

La composición de este medio de incubación es la siguiente:

Fosfato monopotásico	0,1	M
EDTA-MgK	0,001	M
Fluoruro potásico	0,1	M
Cloruro magnésico	0,04	M
Citrato potásico	0,01	M
Tris-ClH	0,12	M
rac- α -glicerofosfato	0,01	M
Acido palmítico	0,0028	M
GSH	0,032	M
CoA	1,2	mM
ATP	0,056	M

Como el ácido palmítico no es soluble en agua se suspendió en CO_3HK 0,1 M mediante sonicación.

Los precursores marcados se añadieron al medio en las siguientes concentraciones

(U-¹⁴C)-L- α -glicerofosfato actividad específica 21,5 mCi/mmol
concentración 3 μ Ci/ml equivalentes a
1,4.10⁻⁴ mmol/ml

ácido (9,10-³H)-palmítico actividad específica 500 mCi/mmol
concentración 6 μ Ci/ml equivalentes a
1,2.10⁻⁵ mmol/ml

Una vez añadidos los precursores se ajusta el pH a 7,8 utilizando KOH 1 M. El ajuste debe hacerse con cuidado pues el pH es un factor muy crítico en la incubación.

Inmediatamente antes de su utilización conviene sonificarlo brevemente para dispersar bien el palmítico que tiende a sedimentar lentamente.

2.7.4 INCUBACION Y CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA PARA SEPARAR FOSFOLIPIDOS

Cada tubo de incubación lleva 0,5 ml de medio de incubación y 0,5 ml de homogeneizado, bien total o de fracción microsomal. Los tubos se incuban en una incubadora de baño de agua con agitación constante y a la temperatura de 37°C. Los tiempos de incubación fueron de 5 y 30 minutos para homogeneizados totales y 0, 2, 5, 10, 15 y 30 minutos para fracción microsomal.

Una vez transcurrido el tiempo se añaden 10 ml. de cloroformo-metanol 2:1 (v/v), se agitan los tubos durante dos minutos, se centrifugan a 3.000 rpm en una centrífuga convencional y se separa la fase clorofórmica que se evapora a sequedad en un evaporador rotatorio.

El residuo seco se disuelve en una pequeña cantidad de cloro-

formo-metanol 2:1 y se aplica en placas de Silicagel G de 20 x 20 y 500 μ de espesor para separar los fosfolípidos. Para el desarrollo de la cromatografía se utilizaron dos sistemas uni y bidimensional.

El sistema unidimensional fue:

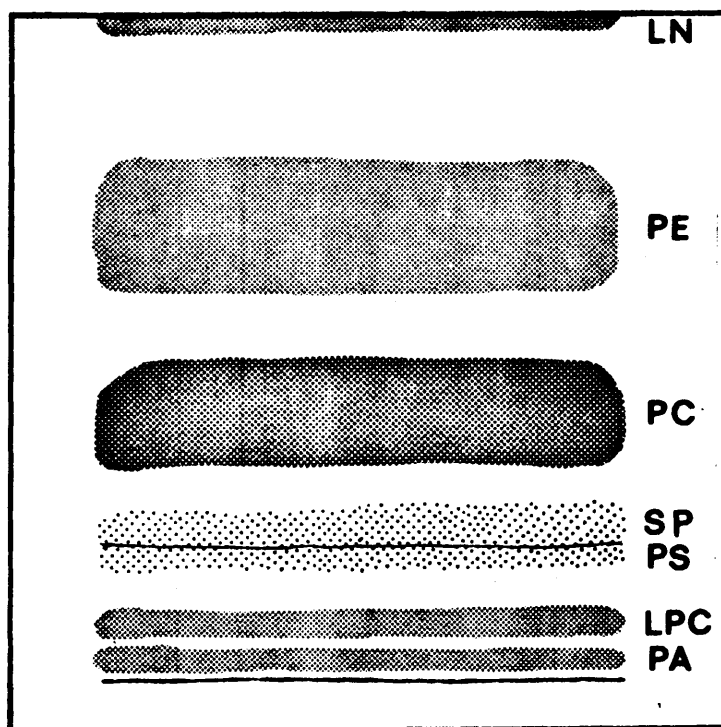
Cloroformo/metanol/ NH_3 25% 66:25:7,5 (v/v/v)

y el sistema bidimensional

sistema I: Cloroformo/metanol/ NH_3 25% 66:25:7,5 (v/v/v)

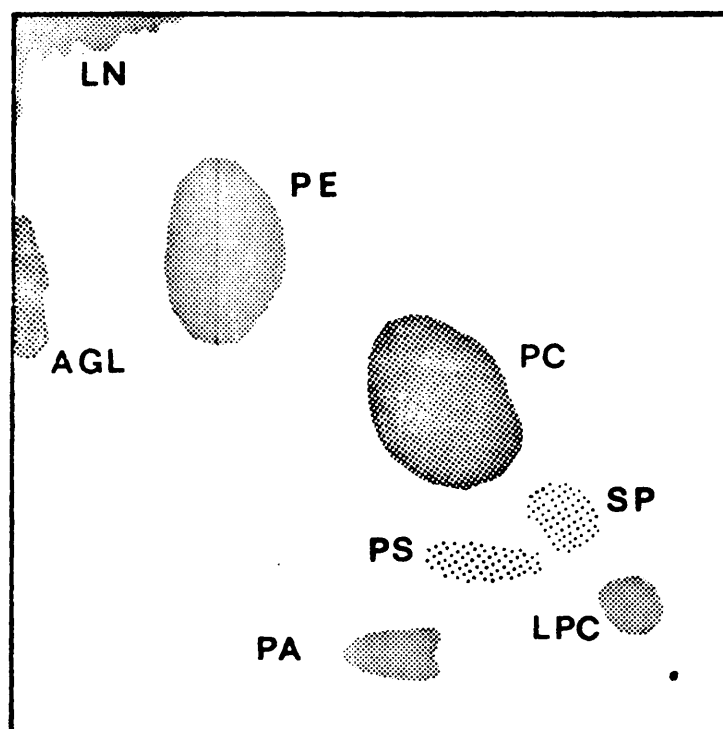
sistema II: Cloroformo/metanol/ NH_3 25% 66:25:5 (v/v/v)

la separación de los distintos fosfolípidos se ve en las figuras siguientes:



Separación de fosfolípidos en cromatografía unidimensional

PA: ácido fosfatídico; LPC: Lisofosfatidilcolina; PC: fosfatidilcolina;
PS: fosfatidilserina; SP: Esfingomielina; PE: fosfatidiletanolamina;
LN: Lípidos neutros.



Separación de fosfolípidos en cromatografía bidimensional

Una vez desarrollado el cromatograma se revela con vapor de yodo obteniéndose unas manchas que se señalan con un punzón. El yodo se sublima calentando suavemente la placa en una estufa durante una hora y las manchas se rascan para su conteo.

2.7.5 MEDIDAS DE RADIOACTIVIDAD POR CENTELLEO LIQUIDO

El conteo de radioactividad se realizó en un contador de centelleo líquido a baja temperatura modelo Unilux II de Nuclear Chicago provisto de doble canal para ^3H y ^{14}C .

Las manchas de fosfolípidos se rascaron y pusieron en viales de

centelleo con 10 ml. de líquido de dioxano-naftaleno cuya composición

Naftaleno	150 gr.
PPO (2,5-difeniloxazol)	10,5 gr.
POPOP (1,4-bis-2-(5-feniloxazolil)-benceno)	0,45 gr.
Dioxano	hasta completar 1.500 cc.
Agua	hasta completar 1.800 cc.

La Silicagel no produce quenching apreciable en las pequeñas - cantidades que se rascan.

Las condiciones del contaje doble se determinaron con patrones de ^3H y ^{14}C de actividad conocida, consiguiendo eficiencias de un - 11-15% para el tritio y 70-75% para el carbono y máxima separación - de los espectros de ambos isótopos en las siguientes condiciones:

Canal A: Tritio Discriminadores: L-0.0

Atenuación: A-0

Canal B: Carbono Discriminadores: L-0.5

U-9.9

Atenuación: D-800

Con los patrones se determinó la ecuación necesaria para calcular las cuentas corregidas de cada isótopo que son las que se exponen en los resultados.

Los resultados que se representan en el apartado 3.5 (figs. 20 a 32) son valores medios con $p < 0,05$.

2.8 VALORACION DE PROTEINAS

En todos los ensayos realizados se lleva a cabo la valoración de proteínas en el preparado enzimático total a fin de calcular actividades enzimáticas específicas y hacer comparables los resultados obtenidos. La valoración de proteínas se realiza por el método de Lowry et al. (1951), del siguiente modo:

Reactivos

Reactivo Folin-Ciocalteu diluido: 1 vol. de reactivo

Folin-Ciocalteu (Merck) + 2 vol. de agua destilada

Reactivo A: CO_3Na_2 al 2% en NaOH 0,1 N

Reactivo B: $\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 0,5% en tartrato sódico al 1%

Procedimiento

En el momento de realizar la valoración se prepara una mezcla de los reactivos A y B en la proporción 50 vol. de A + 1 vol. de B, se pone en cada tubo de ensayo 5 ml de esta mezcla y se añade a cada uno de ellos 1 ml. de la disolución problema, cuyo contenido en proteínas esté comprendido entre 150 y 800 $\mu\text{g/ml}$. Es necesario, por tanto, efectuar las disoluciones adecuadas del preparado enzimático, de modo que la concentración de proteína se encuentre entre los límites citados. La mezcla después de agitar, se deja a temperatura ambiente durante 30 minutos. A continuación se añade a cada tubo 0,5 ml. del reactivo Folin diluido. La mezcla se deja 40 minutos a temperatura ambiente con agitación periódica, apareciendo en los tubos una coloración azul cuya absorbencia se mide a 500 $\text{m}\mu$ frente a un blanco constituido por una mezcla preparada según se ha descrito anteriormente, sustituyendo la disolución problema por 1 ml de agua destilada.

La concentración de proteínas en el problema se deduce a partir de una curva patrón construida con los datos de absorbencia obtenidos con diferentes disoluciones de albúmina de concentración conocida. Es ta curva patrón se construye para cada valoración de proteínas. Para la preparación de estas disoluciones patrón se ha utilizado en todos los casos albúmina cristalizada de suero de bovino (Sigma).

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 ANALISIS CUANTITATIVO DE ACIDOS GRASOS DE LIPIDOS TOTALES, FOSFO LIPIDOS Y TRIGLICERIDOS EN HIGADO MATERNO Y FETAL DE CONEJOS, VARIACIONES INDUCIDAS POR LA GESTACION Y ADMINISTRACION PROLONGADA DE INSULINA.

En la figura 4 se expresa la composición de ácidos grasos de lípidos totales de hígado de conejas normales (4 A) y de hígado de animales gestantes (4 C), de conejas tratadas con insulina (4 B) y de animales gestantes tratados con insulina (4 D). Se observa claramente que la gestación modifica la composición normal de ácidos grasos de lípidos totales de hígado, siendo los cambios más notables el incremento de ácido palmítico y el descenso de los ácidos esteárico y linoleico. La administración prolongada de insulina no provoca alteraciones en la composición de ácidos grasos totales, tanto en animales normales como en animales gestantes.

Los lípidos totales de hígado de los animales control se fraccionaron en el triglicéridos y fosfolípidos y se estudió la composición de ácidos grasos en ambas clases de lípidos. También se fraccionaron del mismo modo los lípidos totales de hígado procedentes de los animales gestantes y de los tratados con insulina.

En la figura 5 se muestra la composición de ácidos grasos de triglicéridos. La característica principal de los triglicéridos de hígado de los animales control (5 A) son los bajos niveles de ácido esteárico, mientras que los fosfolípidos correspondientes muestran elevados niveles de ácido linoleico. Los triglicéridos de hígado de coneja gestante (5 C) presentan niveles inferiores de ácido esteárico y superiores de ácidos palmítico con respecto a los de los animales control. Parece por tanto que estos cambios en la composición de ambos ácidos grasos saturados de los triglicéridos de hígado de los animales gestantes son responsables de las variaciones de su concentración provocadas por la gestación en ácidos grasos totales.

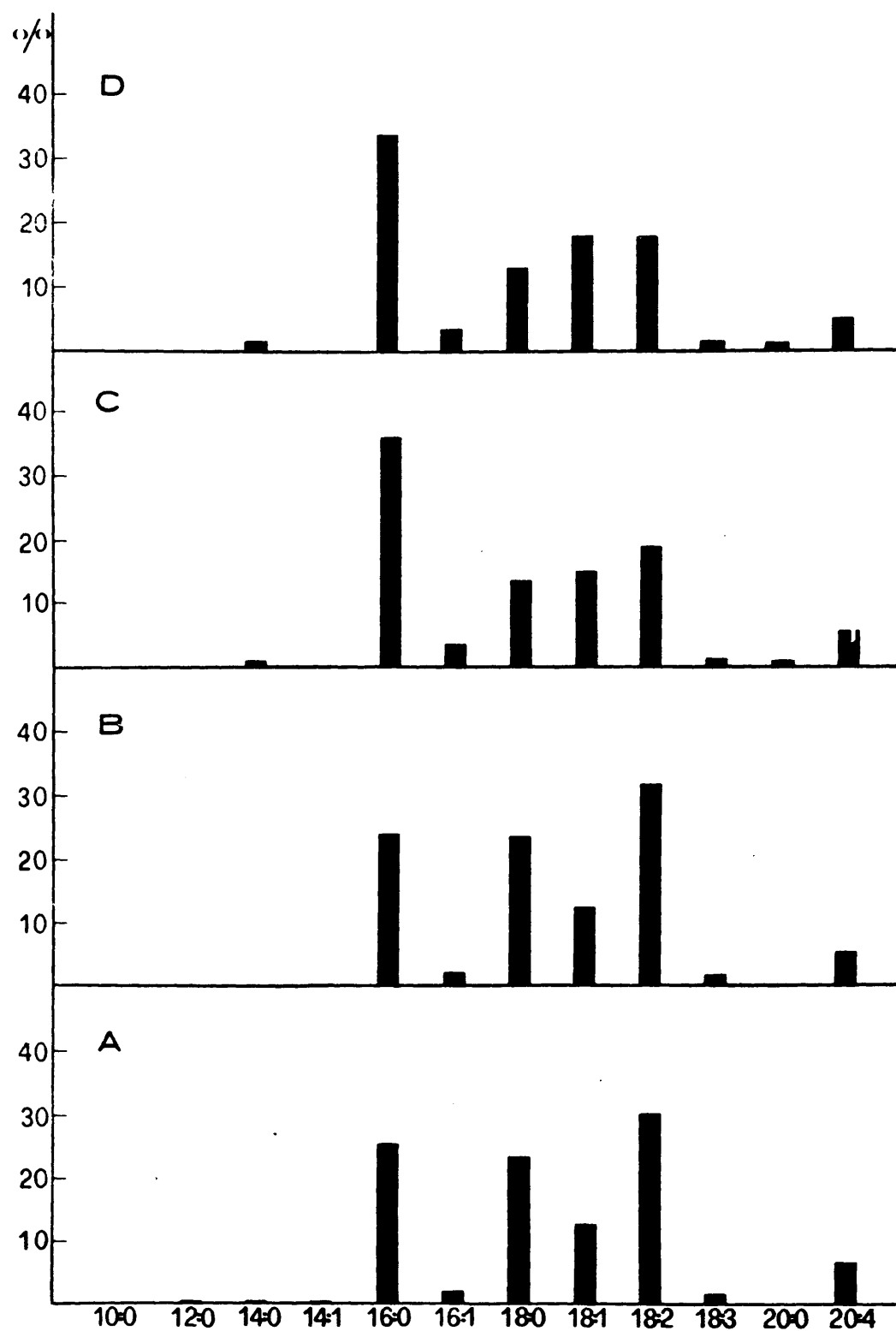


Fig. 4. Composición de ácidos grasos de lípidos totales en hígado. (A) Animales control. (B) Animales tratados con insulina. (C) Animales gestantes. (D) Animales gestantes tratados con insulina.

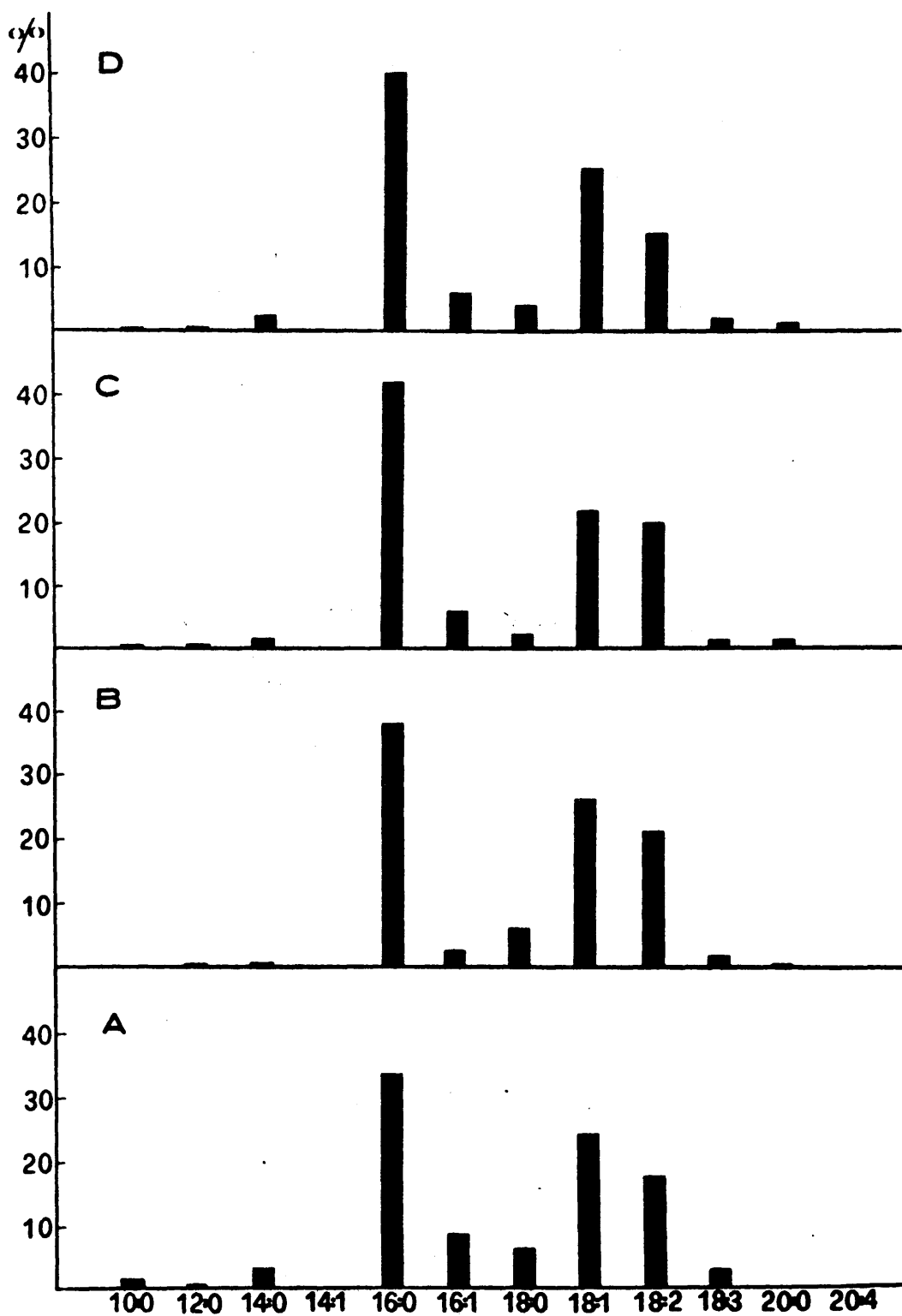


Fig. 5. Composición de ácidos grasos de triglicéridos de hígado.
Explicación como en la figura 4.

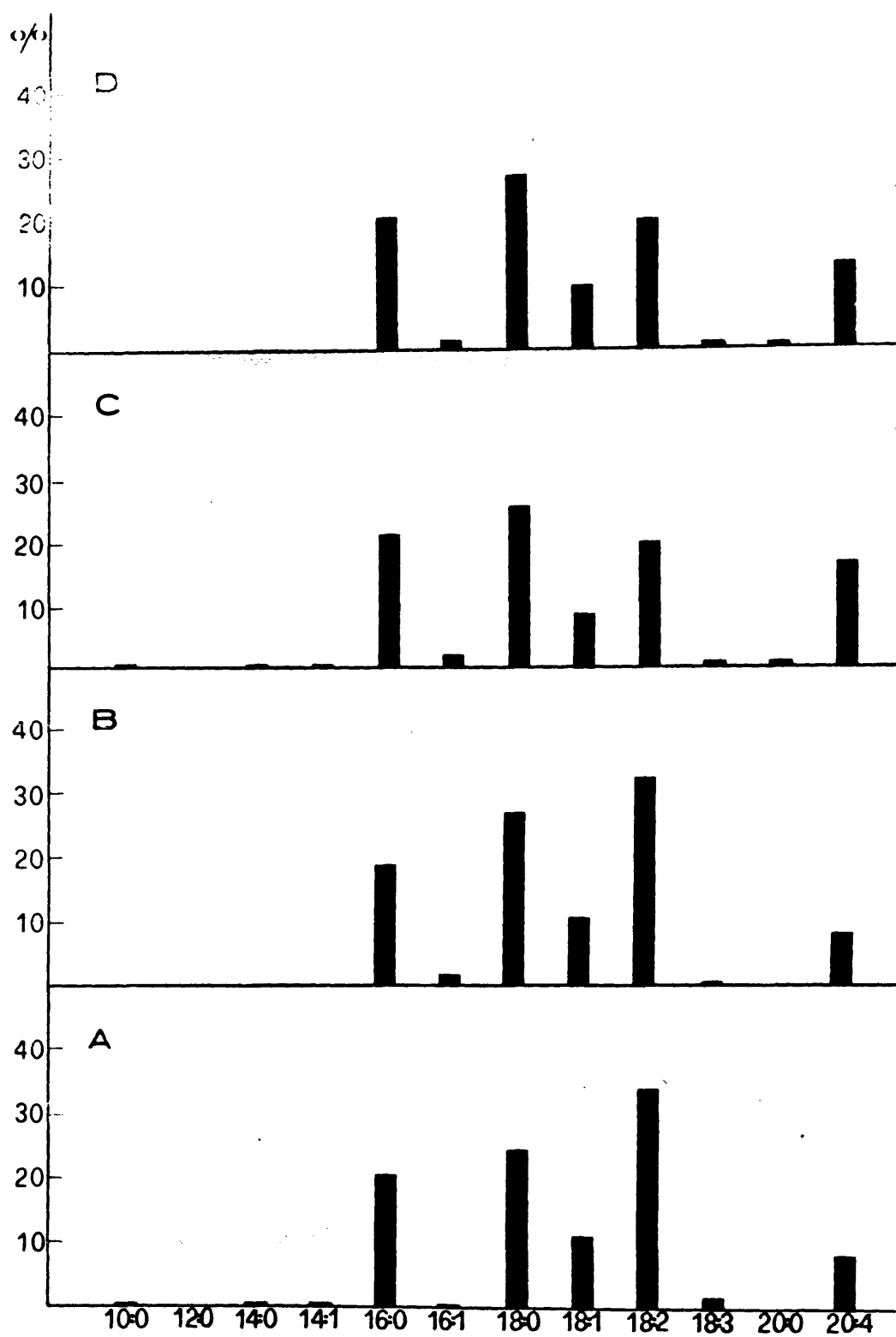


Fig. 6. Composición de ácidos grasos en fosfolípidos de hígado.
Explicación como en la figura 4.

La observación de la figura 6 muestra claramente que los fosfolípidos de hígado de conejas gestantes (6 C) presentan una composición de ácidos grasos caracterizada por bajos niveles de ácido linoleico. Así pues, parece claro que triglicéridos y fosfolípidos son responsables de los cambios en la composición de ácidos grasos de los lípidos totales de hígado provocados por la gestación; los triglicéridos son responsables de los cambios en la concentración relativa de los ácidos grasos saturados 16:0 y 18:0, mientras que la disminución de ácido linoleico es debida a los fosfolípidos.

Todos estos cambios en la composición de ácidos grasos se reflejan claramente en los valores del grado de insaturación (tabla I). En primer lugar, resulta obvio que de cada grupo de animales los ácidos grasos de los triglicéridos son más saturados que los de los fosfolípidos. En segundo lugar, la gestación induce una variación en el grado de insaturación de los lípidos totales, incrementando la proporción de los ácidos más saturados. Esta disminución del grado de insaturación es debida a la contribución de triglicéridos más saturados.

TABLA I

Grado de insaturación de los ácidos grasos de lípidos totales, triglicéridos y fosfolípidos de hígado de los diferentes grupos de conejos.

	<u>lípidos totales</u>	<u>triglicéridos</u>	<u>fosfo- lípidos</u>
Controles	1,05	0,76	1,16
Tratados con insulina	1,02	0,78	1,12
Gestantes	0,88	0,72	1,21
Fetos	0,79	0,81	0,67

También se ha estudiado la composición de ácidos grasos totales, de triglicéridos y de fosfolípidos en hígado de fetos a término. La figura 7 muestra la composición de ácidos grasos totales de hígado fetal ($7 C_f$) comparada con la del control adulto. Se observa que el hígado fetal posee concentraciones superiores de los ácidos grasos monoin-saturados 16:1 y 18:1, mientras que disminuye claramente el poliinsatu-rado 20:4; los niveles de ácido esteárico son significativamente más - bajos que los del hígado materno. Estas concentraciones de ácidos gra-sos dan como resultado un valor del grado de insaturación de los lípi-dos totales del hígado fetal que es inferior al del hígado materno (ta-bla I).

Los lípidos fetales se fraccionaron también en triglicéridos y - fosfolípidos y su composición se ha comparado también con la de los - adultos control (A). Los valores relativos del grado de insaturación - de ambas clases de lípidos de hígado fetal se expresan en la tabla I. El valor superior del grado de insaturación de los triglicéridos del - hígado fetal es debido al descenso en la concentración de ácido palmí-tico con respecto a los triglicéridos maternos. Los ácidos grasos de - los fosfolípidos fetales se caracterizan por su reducido grado de insa-turación, notablemente inferior al de los fosfolípidos de las conejas control y gestantes, y es inferior incluso al de los triglicéridos del hígado fetal, lo cual constituye un aspecto interesante de los lípidos fetales. La composición porcentual de ácidos grasos de los fosfolípi-dos de hígado fetal (figura 9 C_f) se caracteriza sobre todo por los ba-jos niveles de los ácidos poliinsaturados 18:2 y 20:4 en relación a - los fosfolípidos maternos.

Las comparaciones entre la composición de ácidos grasos de las - clases de lípidos fetales (figuras 8 C_f y 9 C_f) y las de lípidos mater-nos (figuras 5 B y 6 B) y lípidos de conejas control (figuras 5 A y -

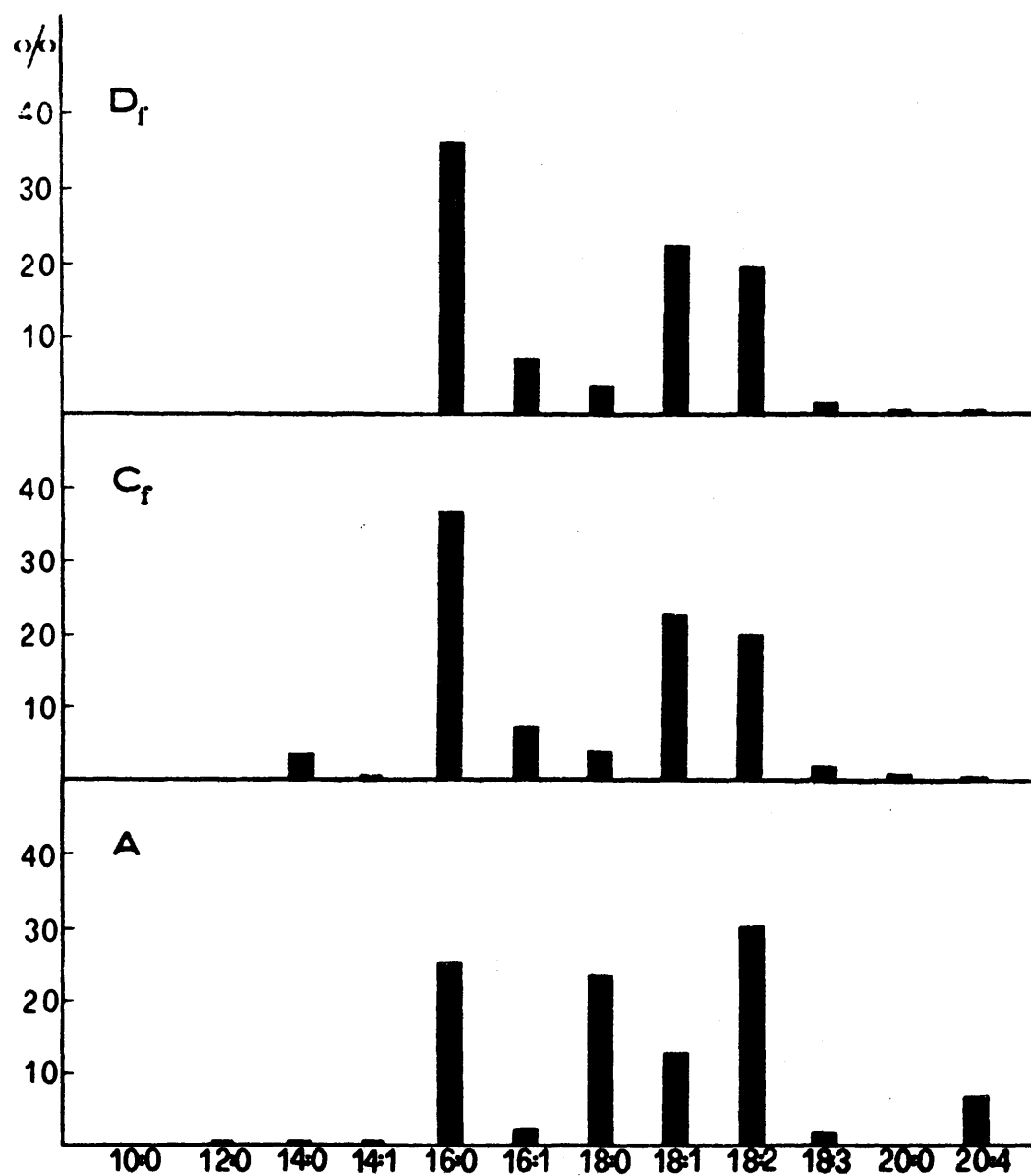


Fig. 7. Composición de ácidos grasos totales de hígado. (A) Animales control. (C_f) Hígado de fetos de animales gestantes control. (D_f) Hígado de fetos de animales gestantes tratados con insulina.

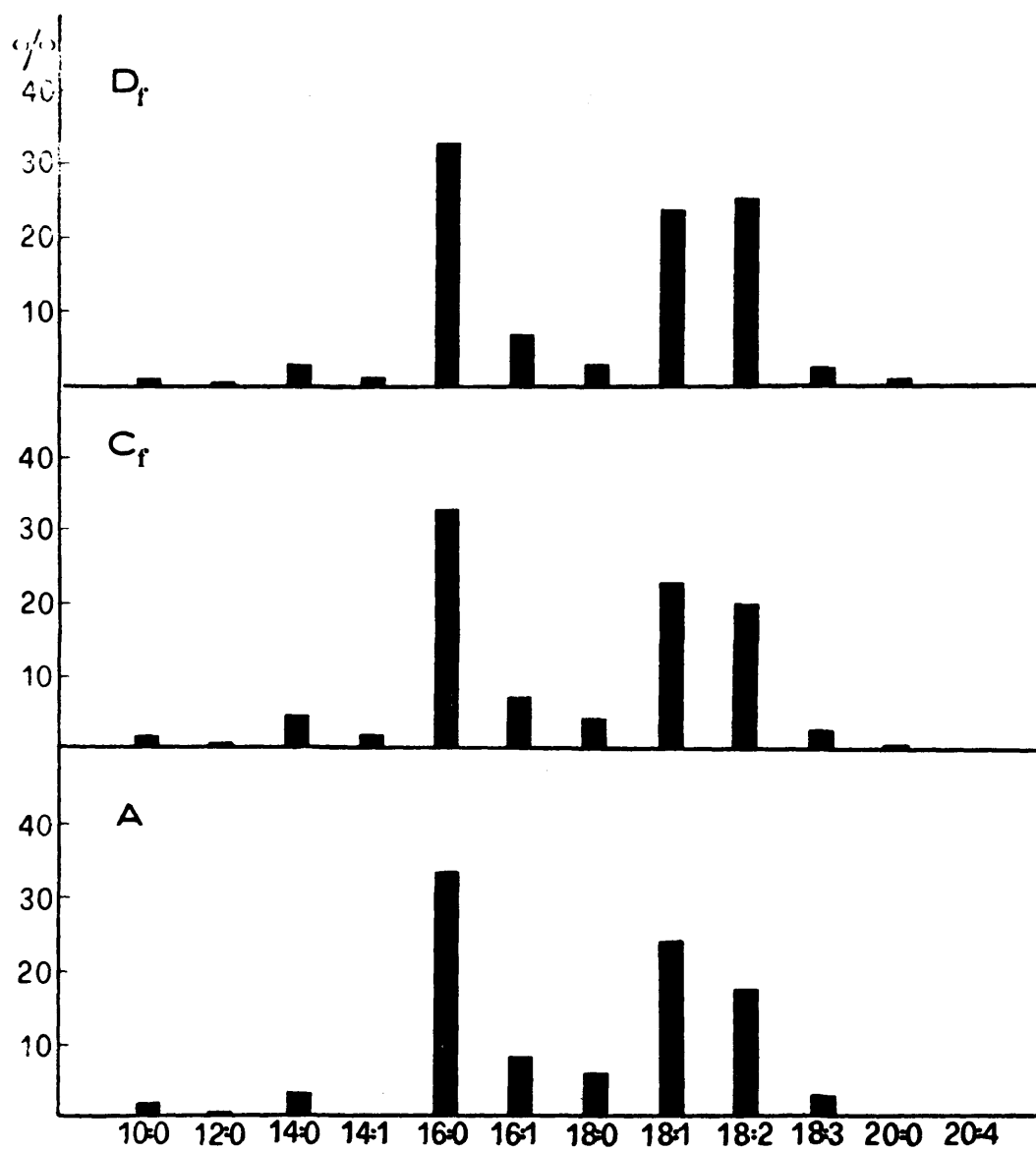


Fig. 8. Composición de ácidos grasos de triglicéridos de hígado.
Explicación como en la figura 7.

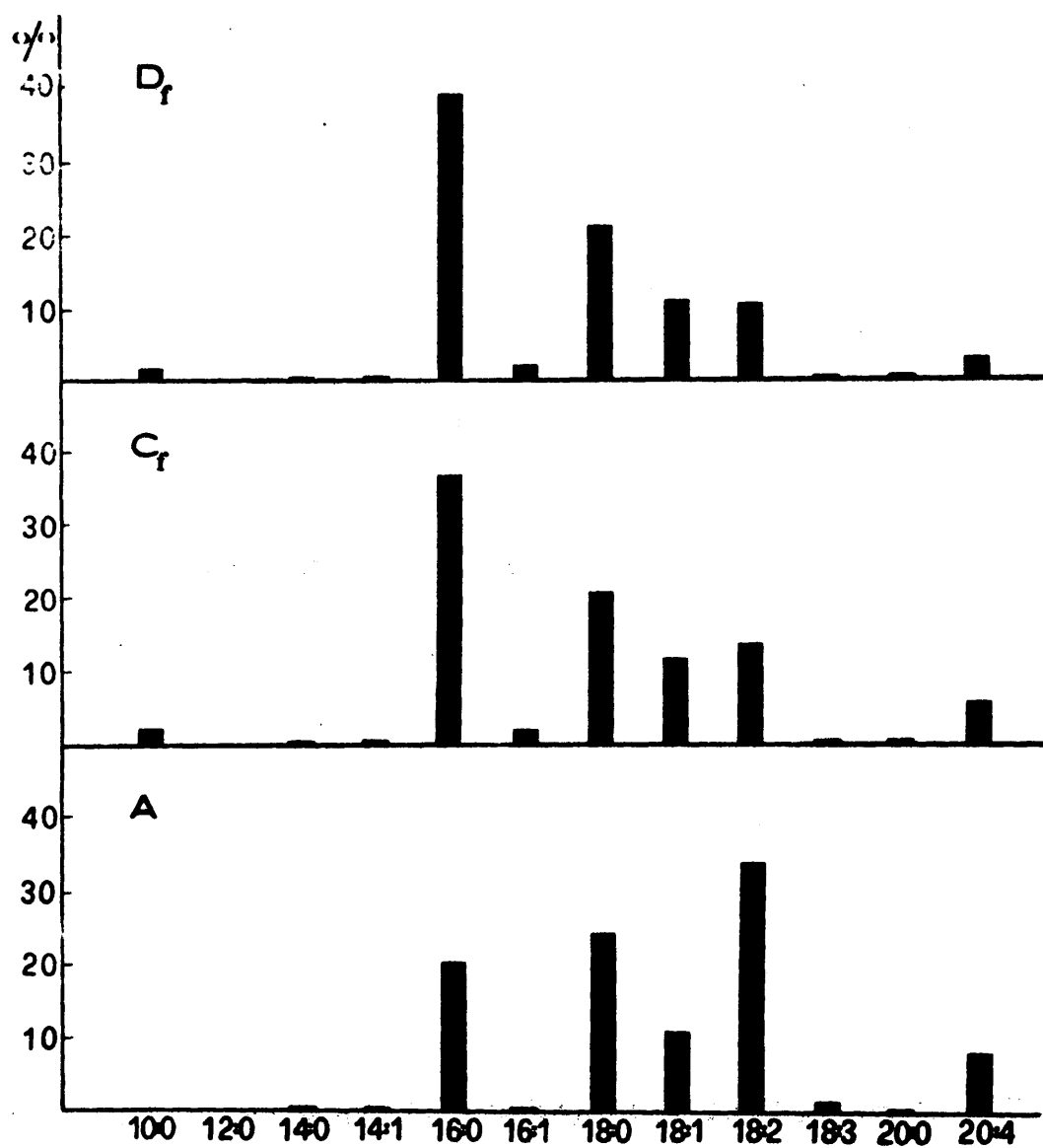


Fig. 9. Composición de ácidos grasos de fosfolípidos de hígado.
Explicación como en la figura 7.

6 B) permiten deducir que la composición de ácidos grasos de los triglicéridos del hígado fetal (figura 8) es más similar a la del adulto normal que a la composición de los triglicéridos del hígado materno. Sin embargo, la composición de ácidos grasos de fosfolípidos del hígado fetal (figura 9) presenta marcadas diferencias con respecto a los fosfolípidos tanto de adultos control como gestantes; esta diferencia es debida al descenso en los porcentajes relativos de ácidos grasos insaturados que hace a los fosfolípidos fetales considerablemente más saturados que los maternos.

Se realizaron estudios similares en hígado de animales tratados con insulina y de animales gestantes tratados con insulina. Como ya se ha mencionado, la administración de insulina no modifica la composición de ácidos grasos totales (figura 4 B), y tampoco se observan cambios en la composición de ácidos grasos de triglicéridos (figura 5 B) ni en la de fosfolípidos (figura 6 B). Por otra parte, el efecto que sobre la composición de ácidos grasos de lípidos totales y de las clases de lípidos ejerce la gestación no se altera prácticamente como consecuencia de la administración de insulina durante un período prolongado de tiempo (figuras 4 D, 5 D y 6 D).

La administración de insulina a las conejas gestantes tampoco influye sobre la composición de los lípidos de hígado fetal, ni en lípidos totales (figura 7 D_f) ni en las clases de lípidos (figuras 8 D_f y 9 D_f).

3.2 DISTRIBUCION POSICIONAL DE ACIDOS GRASOS EN FOSFATIDILCOLINA DE HIGADO Y PULMON MATERNO Y FETAL DE CONEJOS. VARIACIONES CUANTITATIVAS INDUCIDAS POR LA GESTACION Y LA ADMINISTRACION PROLONGADA DE INSULINA.

La figura 10 muestra la distribución de ácidos grasos en fosfa-

tidilcolina de hígado de conejos adultos control (A) y gestantes (B). Las diferencias entre ambos concuerdan con los resultados anteriores referidos a la composición de ácidos grasos en fosfolípidos totales; así, los ácidos insaturados 18:2 y 20:4 son los responsables de estas diferencias en fosfolípidos totales y en fosfatidilcolina de hígado. La distribución de ácidos grasos entre las posiciones 1 y 2 de la fosfatidilcolina de hígado no se afecta por la gestación.

La distribución de ácidos grasos entre las posiciones 1 y 2 de las fosfatidilcolinas aisladas de hígado de fetos se da en la figura 11. Estos resultados muestran que la relación de ácidos grasos saturados presentes en la posición 1 a los de la posición 2 es notablemente inferior a la misma relación existente en hígado materno (tabla II).

TABLA II

Relación entre las posiciones 1/2 de ácido palmítico

<u>HIGADO</u>			<u>PULMON</u>		
<u>Control</u>	<u>Madre</u>	<u>Feto</u>	<u>Control</u>	<u>Madre</u>	<u>Feto</u>
7.7	7.9	2.0	2.7	2.2	1.9

La administración de insulina durante un período de tiempo prolongado no modifica la distribución de ácidos grasos en fosfatidilcolina en hígado materno ni en hígado fetal.

La figura 12 muestra la distribución de ácidos grasos en fosfatidilcolina de pulmón de conejos control (A) y gestantes (B). La figura 13 presenta la distribución de ácidos grasos en fosfatidilcolina de pulmón fetal. Hay que destacar el hecho de que la abundante presencia de ácido palmítico en pulmón provoca que una gran proporción de -

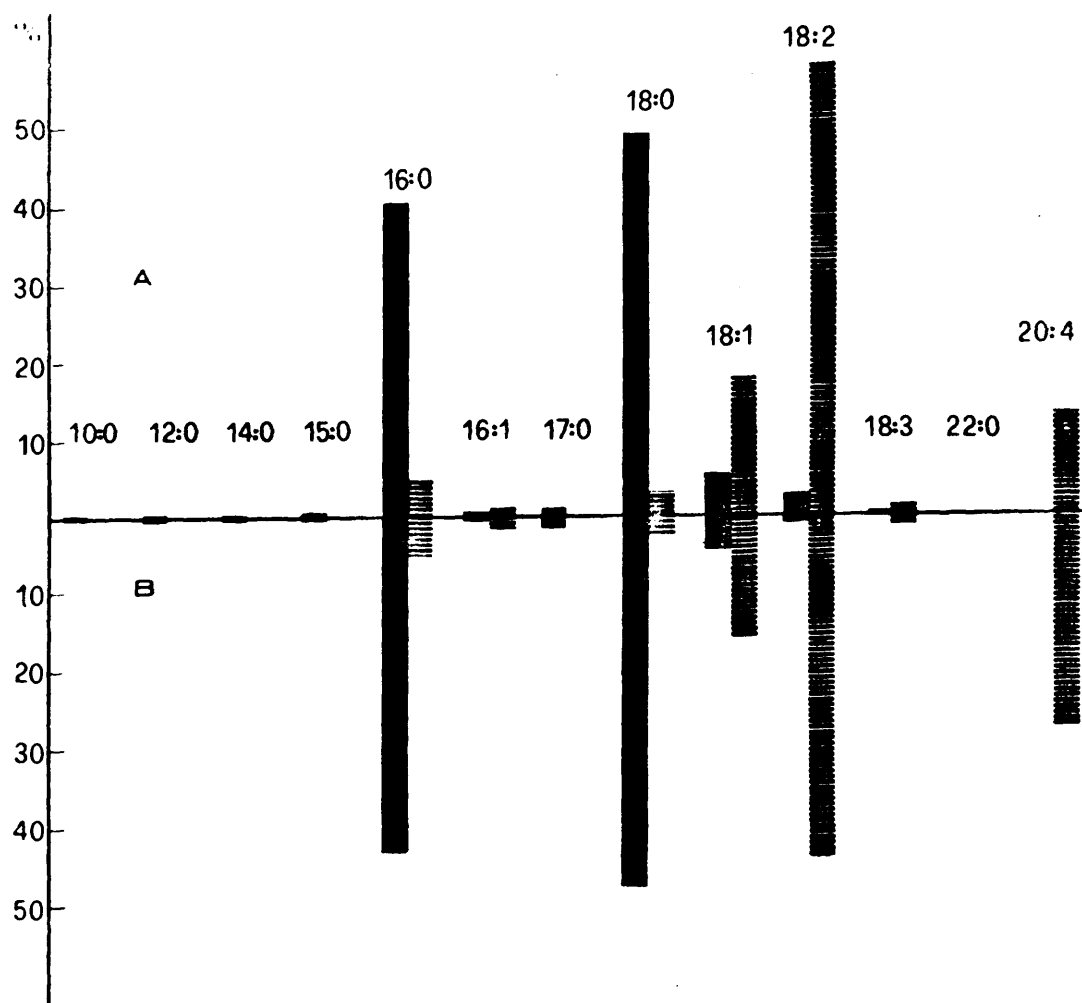


Fig. 10. Distribución de ácidos grasos en fosfatidilcolina de hígado de conejas control (A) y gestantes (B). Barras negras = posición 1; Barras rayadas = posición 2.

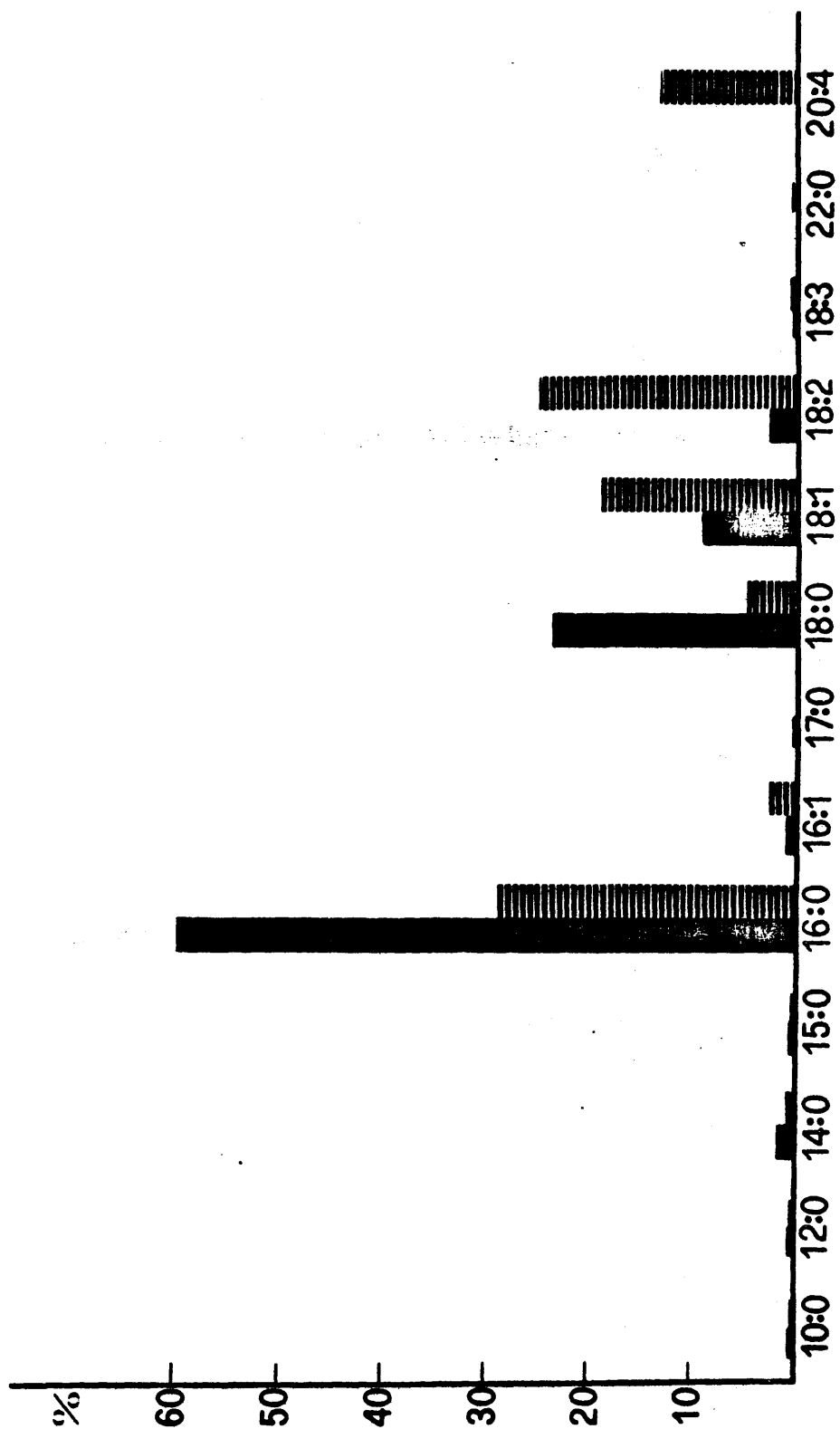


Fig. 11. Distribución de ácidos grasos en fosfatidilcolina de hígado fetal. Símbolos como en la figura 10

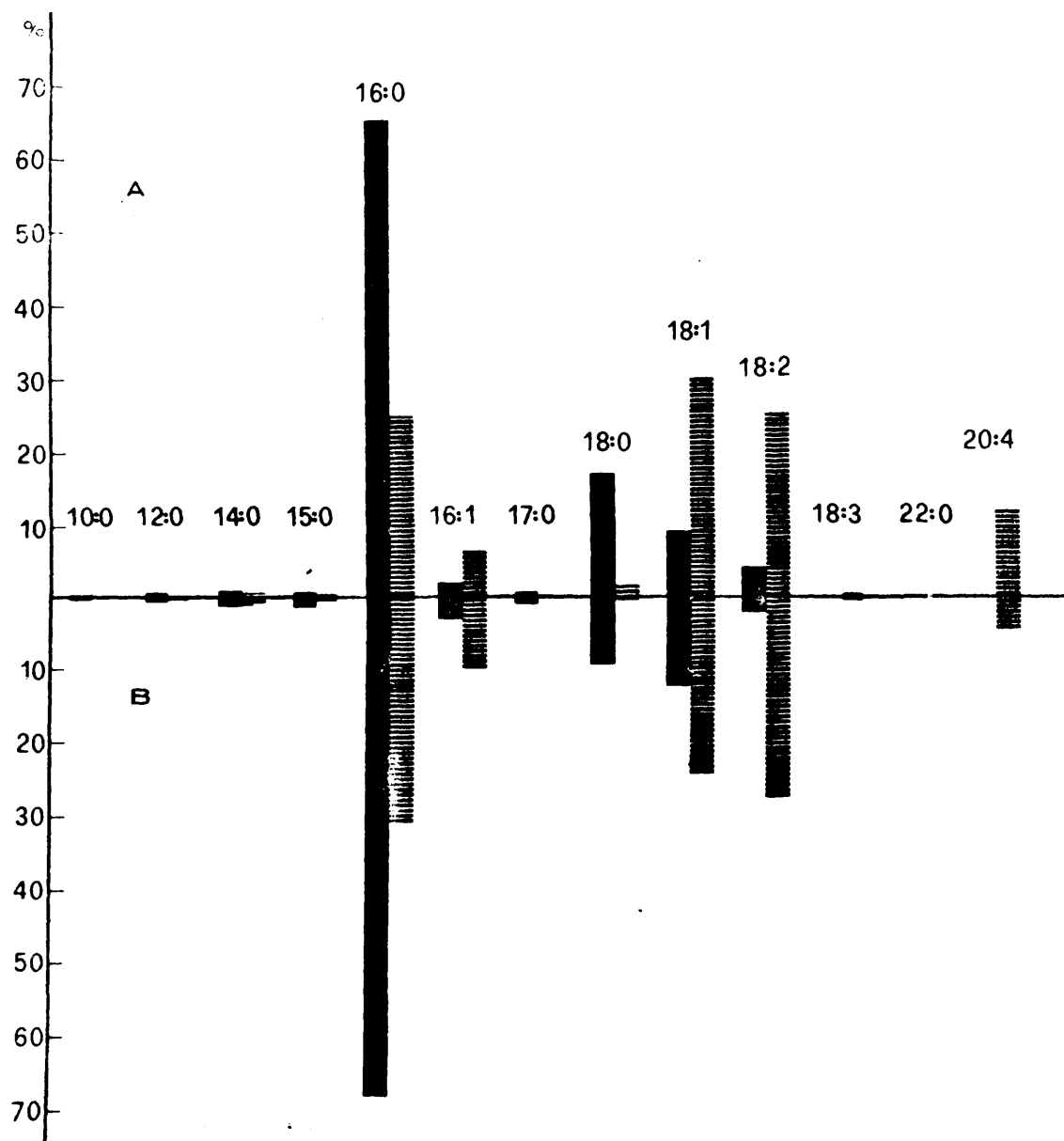


Fig. 12. Distribución de ácidos grasos en fosfatidilcolina de pulmón de conejas control (A) y gestantes (B). Símbolos como en la fig. 10.

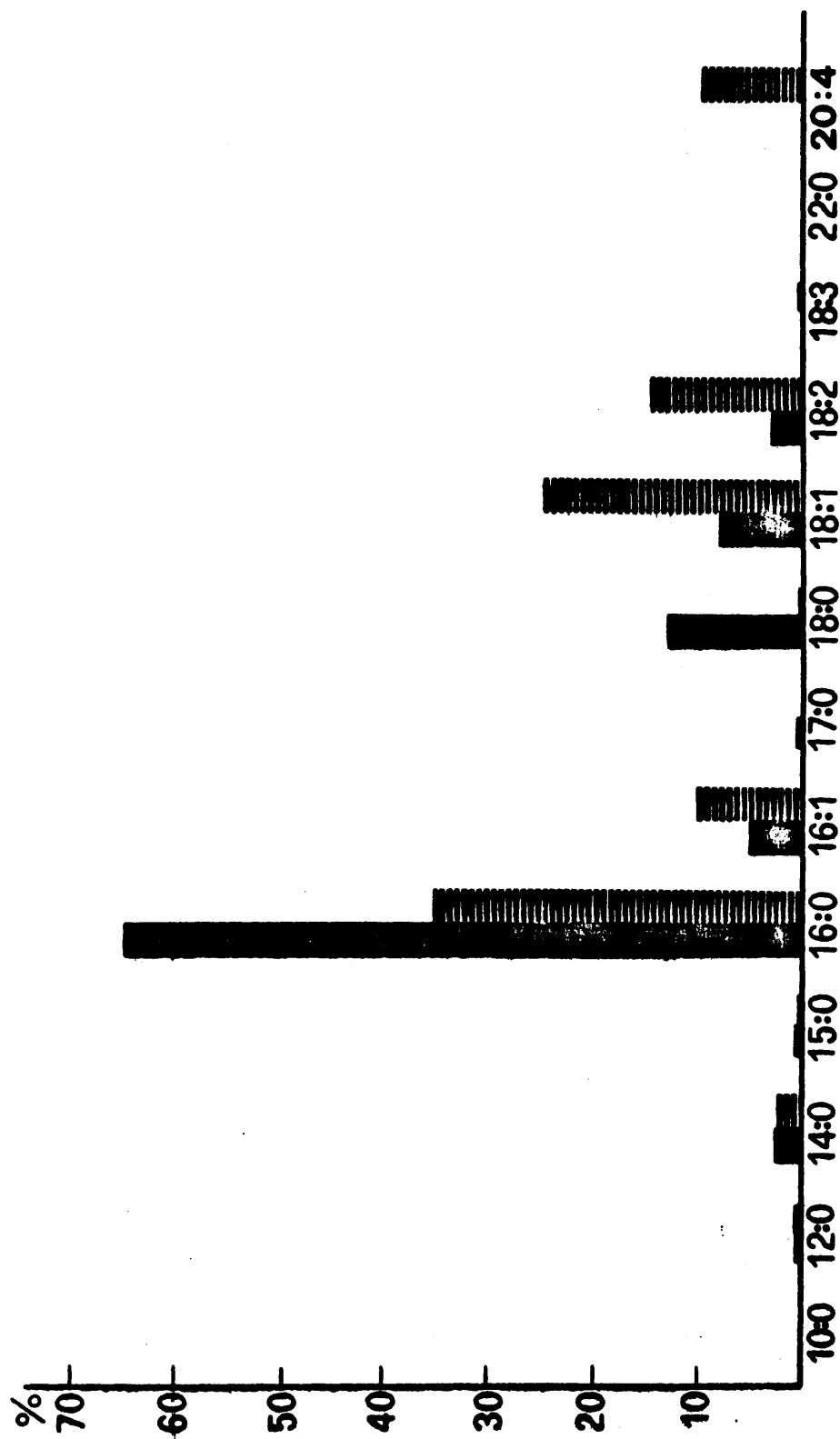


Fig. 13. Distribución de ácidos grasos en fosfatidilcolina de pulmón fetal. Símbolos como en la figura 10.

este ácido esté localizada en la posición 2 de los fosfolípidos de - pulmón materno y control; esto hace que la relación de ácido palmítico entre las posiciones 1/2 sea menor en pulmón que en hígado (tabla II).

Estos resultados están de acuerdo con el descubrimiento de Verreyken et al. (1972) sobre los mecanismos que actúan en la biosíntesis de fosfatidilcolinas en hígado y pulmón de rata. Estos autores - destacan la significativa incorporación de ácido palmítico en la posición 2 de 1-palmitoil-sn-glicero-3-fosforilcolina en presencia de microsomas de pulmón, en contraste con los microsomas de hígado que provocan sólo una muy limitada incorporación de ácido palmítico. Así pues, parece que en la formación de dipalmitoil-lecitina en pulmón desempeña un papel importante un mecanismo de desacilación-reacilación, mientras que en la formación de moléculas de lecitina que contienen ácido linoleico en hígado funciona primordialmente un mecanismo "de novo".

Los valores de la relación entre las posiciones 1/2 del ácido - palmítico (tabla II) obtenidas en fosfatidilcolinas de hígado y pulmón de adulto control y adulto gestante están de acuerdo con aquellas observaciones; sin embargo, los valores de estas relaciones son prácticamente idénticos en fosfatidilcolina de hígado y pulmón de feto, - siendo ambos muy similares a los del pulmón adulto. Es decir, está - claro que la fosfatidilcolina de hígado fetal tiene una distribución de ácido palmítico muy similar a la del pulmón a término que todavía no respira. Este hecho está en la línea de los descritos por Gluck et al (1970) según los cuales el feto de conejo a término almacena grandes cantidades de dipalmitoillecitina así como otras lecitinas, incluyendo algunas especies moleculares que son liberadas a la superficie alveolar después del inicio de la respiración. Sin embargo, el determinar si un mecanismo de desacilación-reacilación es importante en la síntesis de palmitoillecitinas en hígado fetal es una cuestión que debe ser resuelta todavía.

3.3 DISTRIBUCION POSICIONAL DE ACIDOS GRASOS EN FOSFATIDILETANOLAMINA DE HIGADO Y PULMON MATERNO Y FETAL. VARIACIONES CUANTITATIVAS INDUCIDAS POR LA GESTACION Y LA ADMINISTRACION PROLONGADA DE INSULINA.

La figura 14 presenta la distribución de ácidos grasos en fosfatidiletanolamina de hígado de conejas control (A) y gestantes (B). Las diferencias en la composición de ácidos grasos totales entre ambos tipos de animales están de acuerdo con los resultados presentados anteriormente, relativos a la composición de fosfolípidos totales (sección 3.1). Así, por ejemplo, la fuerte disminución de 18:2 debida a la gestación se refleja claramente en la composición de ácidos grasos de fosfatidiletanolamina que, por otra parte, muestra un incremento en el ácido graso poliinsaturado 20:4. Estas diferencias, sobre todo la menor proporción de 18:2 en hígado gestante, han sido observadas también en fosfatidilcolina, según se ha señalado en la sección anterior.

La distribución cuantitativa de ácidos grasos entre las posiciones 1 y 2 de fosfatidilcolina de hígado no se afectaba por la gestación, pero sin embargo se observa una diferencia cuantitativa en esta relación en fosfatidiletanolamina; la gestación provoca un descenso de dicha relación tanto en los ácidos grasos saturados 16:0 y 18:0 como para los insaturados 18:1 y 18:2, debidos respectivamente, a un incremento de sus proporciones en la posición 2 y a un descenso de sus proporciones en la posición 1.

La figura 15 muestra la distribución de ácidos grasos en fosfatidiletanolamina de pulmón de conejas control (A) y gestantes (B). Esta distribución no se afecta cuantitativamente por la gestación, salvo un ligero descenso del ácido esteárico, de modo semejante a lo que ocurría en fosfatidilcolina. La abundante presencia de ácido palmítico en pulmón provoca que una gran proporción de este ácido esté localizada en -

la posición 2 de fosfatidilcolina de pulmón tanto en las conejas control como en las gestantes. Sin embargo esto no ocurre en fosfatidiletanolamina de pulmón de estos dos tipos de animales, por lo que la relación entre las posiciones 1/2 para este ácido es en ambos casos superior a la encontrada en fosfatidilcolina.

La figura 16 presenta la distribución de ácidos grasos en hígado y pulmón fetales. Estos resultados muestran que para ácidos grasos saturados la relación entre las proporciones localizadas en las posiciones 1 y 2 de fosfatidiletanolamina de hígado fetal es notablemente inferior a la relación existente en hígado control y en hígado materno (tabla III); este hecho es similar al observado para ácido palmítico en fosfatidilcolina de hígado fetal. Sin embargo, la relación entre las proporciones de la posición 1 y de la posición 2 de los principales ácidos grasos saturados (16:0 y 18:0) en fosfatidiletanolamina de pulmón fetal alcanza valores superiores al de la fosfatidiletanolamina de hígado fetal, siendo también superiores a los de pulmón de las conejas control y gestantes (tabla III). Este incremento en la relación entre las posiciones 1/2 es debido a una fuerte disminución de los ácidos grasos saturados localizados en la posición 2. Estos resultados no coinciden con las relaciones materno-fetales descritas en la sección anterior para fosfatidilcolina de pulmón.

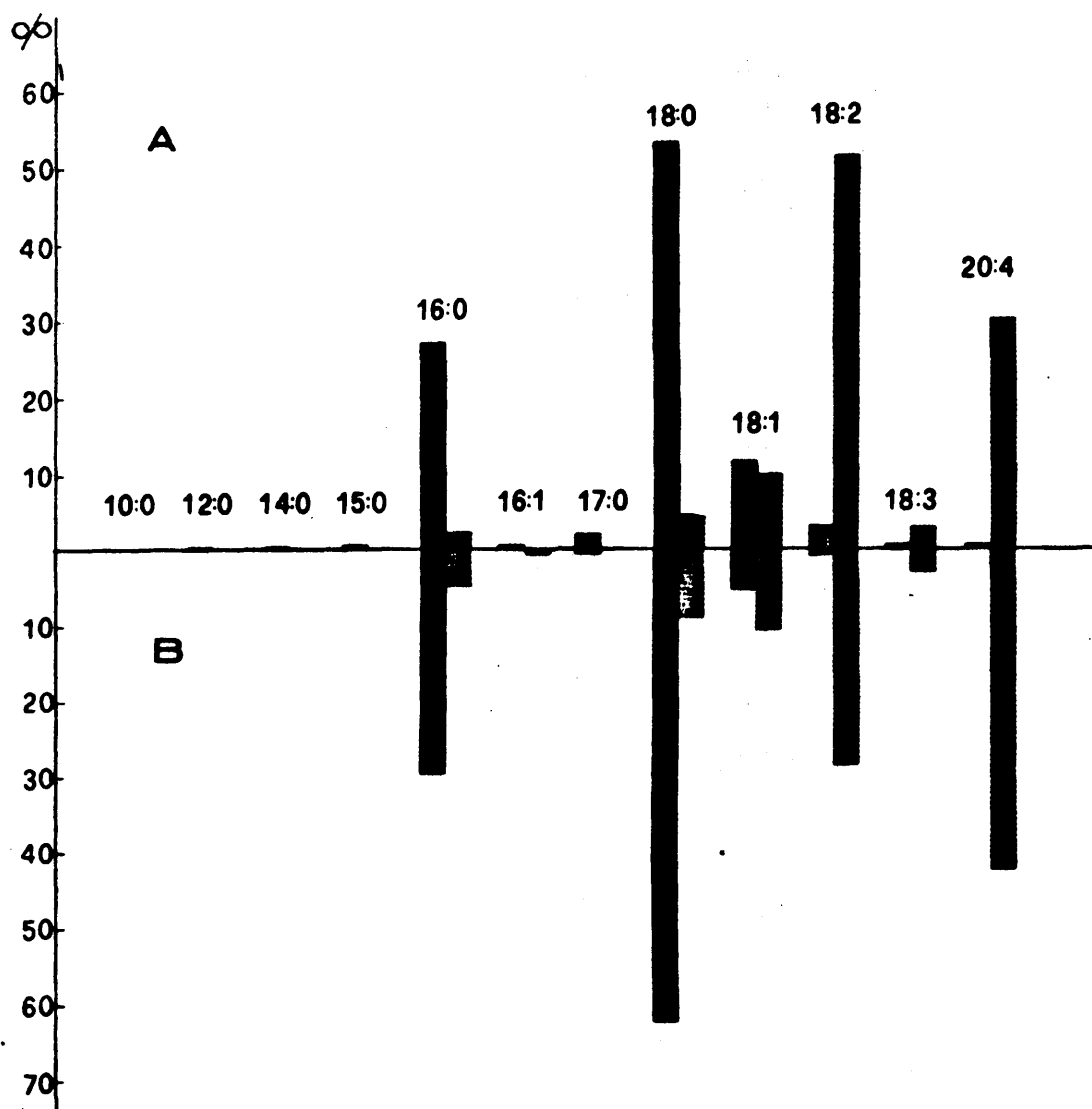


Fig. 14. Distribución de ácidos grasos en fosfatidiletanolamina de hígado de conejas control (A) y gestantes (B). Símbolos como en la figura 10.

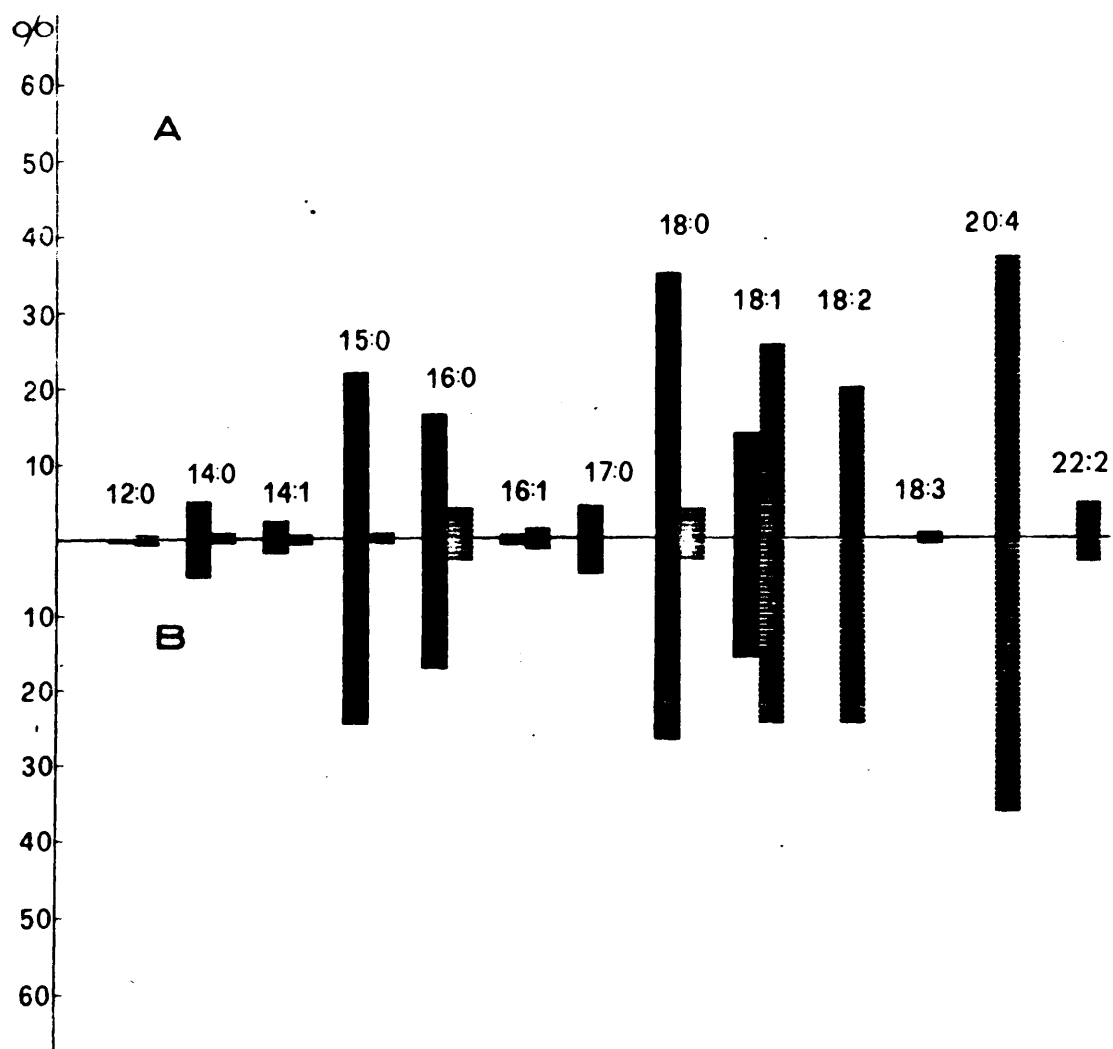


Fig. 15. Distribución de ácidos grasos en fosfatidiletanolamina de pulmón de conejas control (A) y gestantes (B). Símbolos como en la figura 10.

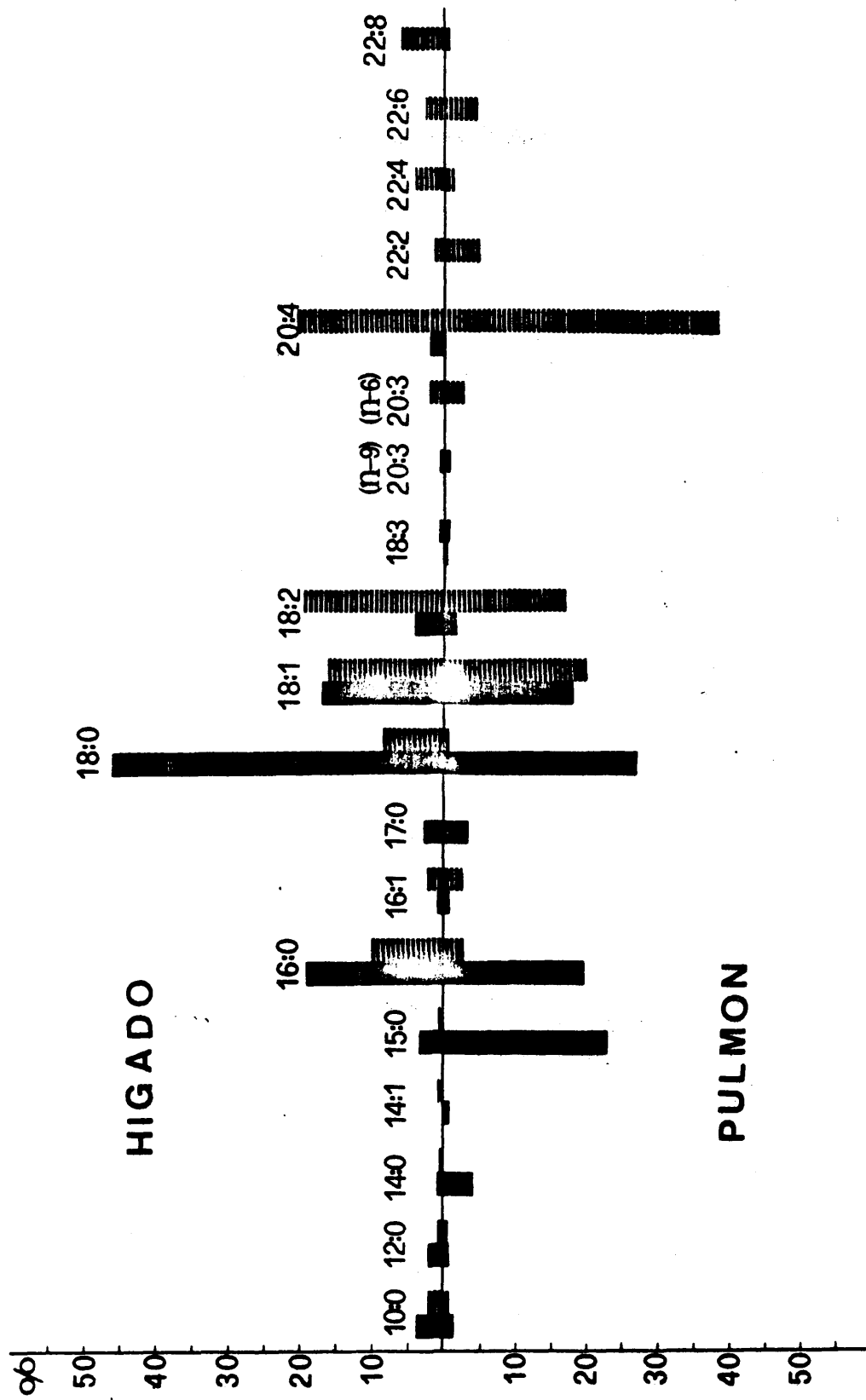


Fig. 16. Distribución de ácidos grasos en fosfatidiletanolamina de hígado y pulmón fetales. Símbolos co-
mo en la figura 10.

TABLA III

Relación entre las posiciones 1/2 de ácidos grasos saturados.

Fosfo- lípidos	Acidos grasos	Hígado			Pulmón		
		control	madre	feto	control	madre	feto
PC	16:0	7,7	7,9	2,0	2,7	2,2	1,9
PE	16:0	11,0	6,0	2,0	4,6	5,9	7,0
PE	18:0	13,0	7,4	5,3	10,0	10,0	26,0

PE = fosfatidiletanolamina : PC = fosfatidilcolina

Se señalaba en la sección anterior que la abundante presencia - de ácido palmítico en la posición 2 de fosfatidilcolina de pulmón de conejas control y gestantes podría ser debida al hecho señalado por - Vereyken et al. (1972) de la participación de un mecanismo de desaci- lación-reacilación en la biosíntesis de dipalmitoil-lecitinas por mi- crosomas de pulmón. El valor de la relación entre las posiciones 1/2 para ácido palmítico en fosfatidilcolina de hígado fetal, similar a - las de pulmón materno y fetal, permite sugerir también la participa- ción de un mecanismo de desacilación-reacilación en la síntesis de - palmitoil-lecitinas en hígado fetal. Sin embargo, los resultados obte- nidos en la distribución de ácido palmítico en fosfatidiletanolamina de pulmón fetal no son consecuentes con una incorporación preferente de palmitato mediante acilación de liso-fosfatidiletanolamina, sino - con el mecanismo "de novo" para la biosíntesis de fosfolípidos. Así - pues, la ausencia de aciltransferasas específicas para fosfatidileta-

anolamina explicaría la inaccesibilidad de una segunda molécula de - palmitato o estearato para unirse a la posición 2 del fosfolípido. Los valores de las relaciones entre las posiciones 1/2 para los ácidos palmítico y esteárico en fosfatidiletanolamina de pulmón fetal, mayores que las existentes en el fosfolípido materno, indicarían una menor participación de las reacciones de intercambio en el pulmón fetal.

Los resultados expresados en la figura 16 indican también la - presencia en fosfatidiletanolamina de hígado y pulmón fetales de cantidades significativas de ácidos grasos insaturados de cadena larga localizados exclusivamente en la posición 2, los cuales no están presentes en las correspondientes fosfatidilcolinas. Este hecho resalta de nuevo el diferente comportamiento metabólico de la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina fetales. Otro hecho característico es la presencia en fosfatidiletanolamina de pulmón fetal de elevadas - proporciones de ácidos grasos impares, concretamente el ácido 15:0, y del ácido poliinsaturado 20:4.

La administración prolongada de insulina no modifica la distribución de ácidos grasos en fosfatidiletanolamina de hígado y pulmón ni en conejas adultas ni en fetos.

3.4 DISTRIBUCION PARCIAL DE ACIDOS GRASOS EN TRIGLICERIDOS DE HIGADO Y PULMON MATERNO Y FETAL. VARIACIONES CUANTITATIVAS INDUCIDAS POR LA GESTACION Y LA ADMINISTRACION PROLONGADA DE INSULINA

Según se ha visto en la sección 3.1, la gestación modifica la composición de ácidos grasos de los lípidos totales de hígado en conejos, siendo los cambios más notables el incremento de la propor- -

ción de ácido palmítico y el descenso de las de esteárico y linoleico. Estos cambios son debidos a las variaciones en la composición de triglicéridos y fosfolípidos; los triglicéridos son responsables de los cambios que la gestación provoca en las concentraciones relativas de los ácidos grasos saturados 16:0 y 18:0.

La composición de los triglicéridos del hígado fetal es más similar a la del adulto normal que a la del hígado materno (tabla IV). Así se puede observar que en los triglicéridos de hígado de conejas gestantes los niveles de 16:0 son mayores y los de 18:0 menores que en las conejas control. Los restantes ácidos grasos no presentan variaciones significativas. En general, la composición de ácidos grasos de los triglicéridos de hígado fetal es semejante a la de los triglicéridos de hígado de las conejas control.

TABLA IV

Porcentajes de ácidos grasos en triglicéridos de hígado de conejas control, conejas gestantes y fetos.

Conejos	14:1	15:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3
Control	3,0	0,7	36,2	7,6	7,5	23,6	20,0	1,1
Gestante	3,0	1,4	45,4	6,3	2,8	21,8	18,2	1,1
Fetos	2,8	1,3	33,9	6,8	3,5	24,1	22,7	2,4

La figura 17 muestra la distribución parcial de ácidos grasos en las posiciones (1 + 3) y 2 de los triglicéridos de hígado de conejas control (A) y gestantes (B). La figura 18 muestra la distribución parcial correspondiente al pulmón de conejas control (A) y gestantes (B).

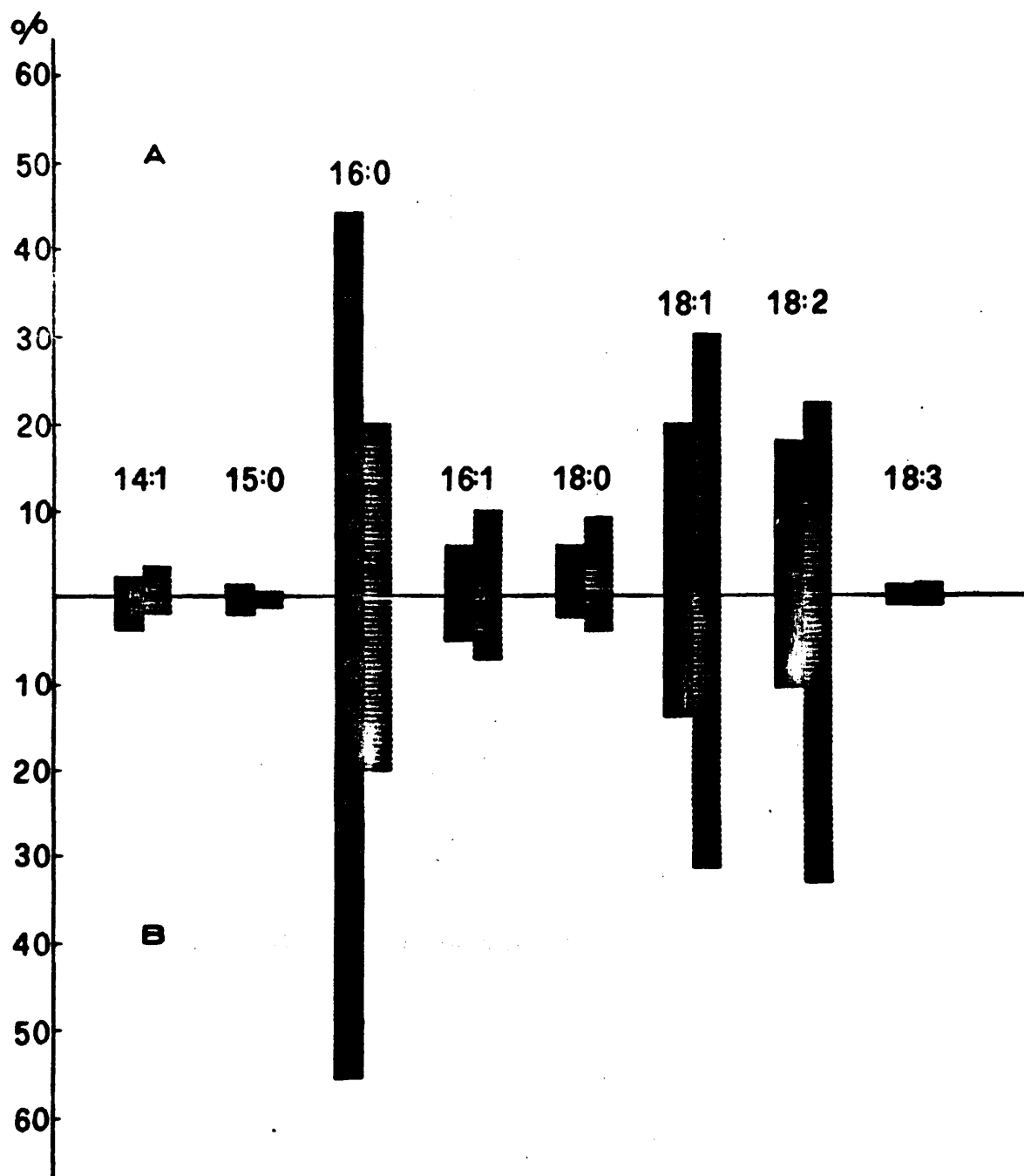


Fig. 17. Distribución parcial de ácidos grasos en triglicéridos en hígado de conejas control (A) y gestantes (B). Barras negras = posición (1 + 3); barras rayadas = posición 2.

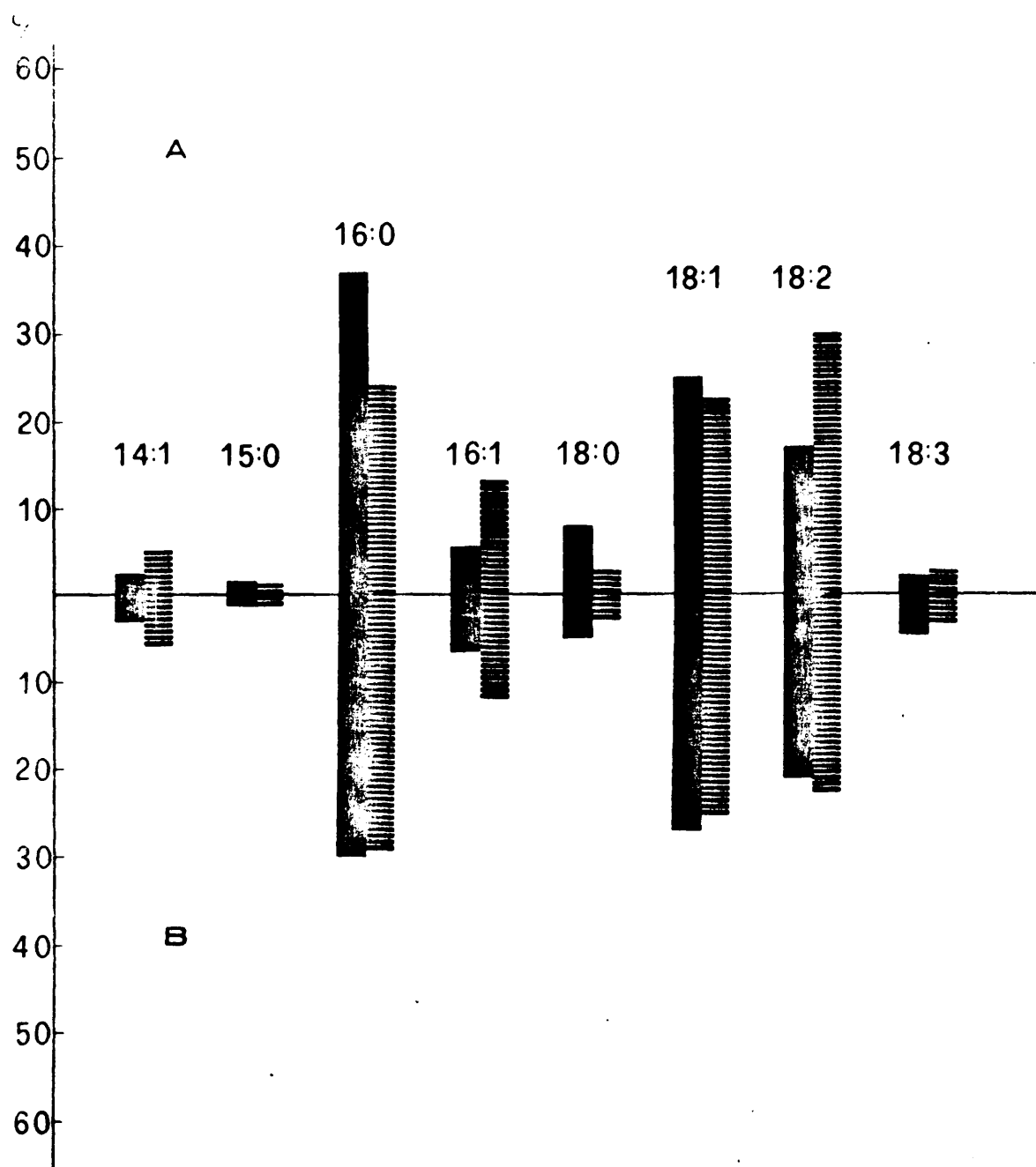


Fig. 18. Distribución parcial de ácidos grasos en triglicéridos de pulmón de conejas control (A) y gestantes (B). Símbolos como en la figura 17.

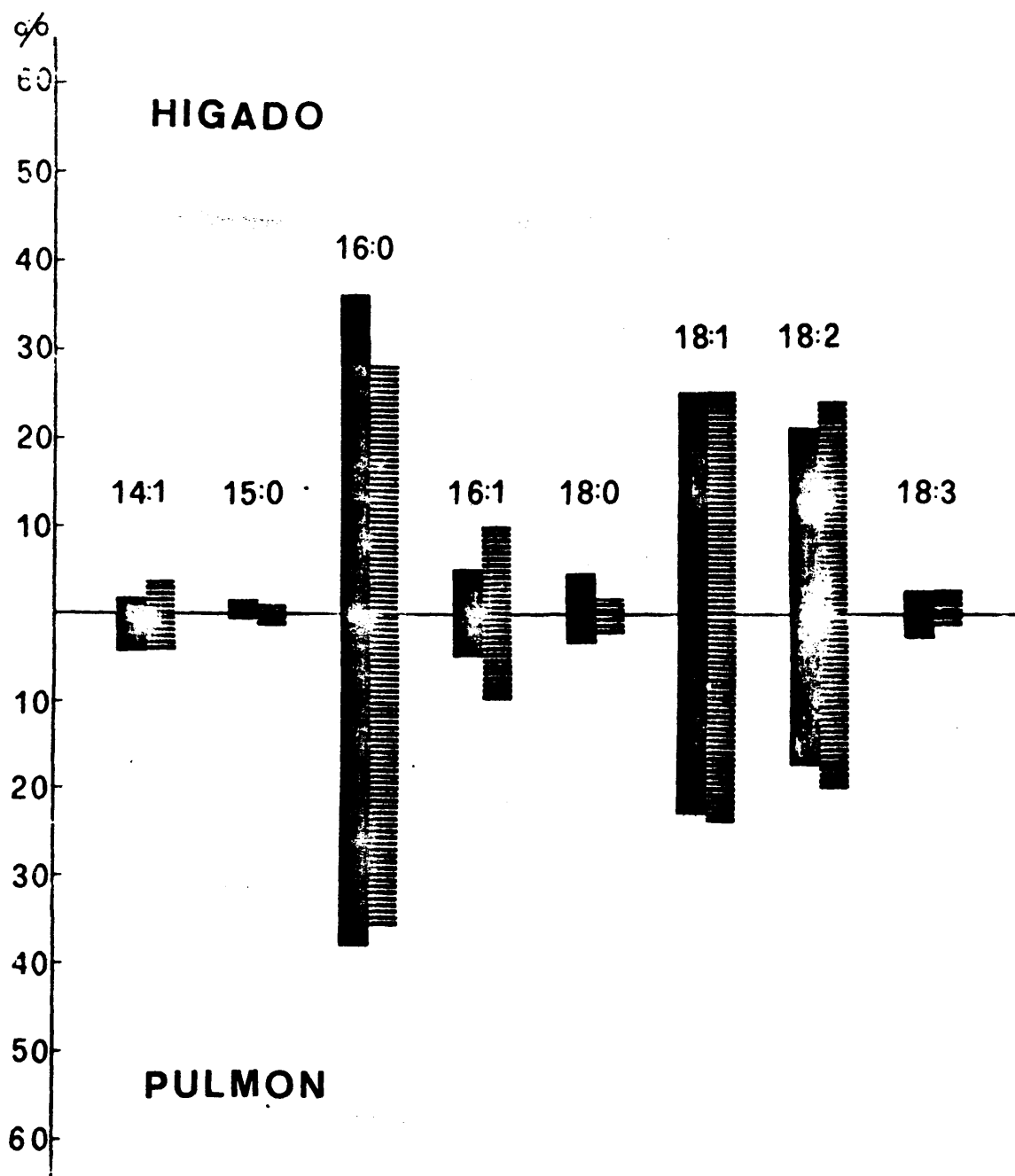


Fig. 19. Distribución parcial de ácidos grasos en triglicéridos de hígado y pulmón fetales. Símbolos como en la figura 17.

En la figura 19 se muestran comparativamente las distribuciones parciales de ácidos grasos en hígado y pulmón fetales.

Los hechos más característicos de la distribución posicional de ácidos grasos en triglicéridos de hígado control (figura 17 A) son las localizaciones preferentes de 16:0 en la posición (1 + 3) y de los ácidos monoinsaturados 16:1 y 18:1 en la posición 2. Los ácidos poliinsaturados, 18:2 y 18:3, no están localizados en la posición 2 tan específicamente como los ácidos grasos monoinsaturados. El incremento de ácido palmítico en los triglicéridos de hígado provocado por la gestación aparece sólo claramente presente en la posición (1 + 3) (figura 17 B).

Por otra parte, existe una clara tendencia hacia una mayor especificidad en la distribución de los ácidos grasos insaturados 18:1 y 18:2 en los triglicéridos de hígado de conejas gestantes. La observación de la figura 19 muestra una especificidad notablemente menor en la distribución de ácidos grasos en las posiciones (1 + 3) y 2 que en los triglicéridos de hígado de conejas control y gestantes: en cualquier caso, la distribución parcial en los triglicéridos fetales es más similar a la de los triglicéridos control que a la de los triglicéridos maternos. El ácido palmitoleico, sin embargo, aparece idénticamente distribuido en triglicéridos de hígado control y de hígado materno y fetal.

Estos resultados parecen indicar la participación en hígado fetal y adulto de mecanismos de síntesis de triglicéridos con una diferente especificidad según los ácidos grasos.

En la tabla V se expresa la composición de ácidos grasos de triglicéridos de pulmón de conejas control, conejas gestantes y fetos. Resulta evidente que la gestación no induce variaciones significativas en la composición de ácidos grasos de los triglicéridos. Los triglicéridos de pulmón fetal tienen proporciones mayores de ácido palmítico -

y menores de esteárico de los de pulmón adulto.

TABLA V

Porcentajes de ácidos grasos en triglicéridos de pulmón de conejas control, conejas gestantes y fetos.

Conejos	14:1	15:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3
Control	3,2	1,2	32,4	8,1	6,2	24,7	21,5	2,5
Gestantes	3,6	1,1	29,9	8,5	4,0	25,9	21,8	4,2
Fetos	4,2	1,0	37,3	6,6	2,9	23,3	18,6	2,5

La figura 18 muestra las distribuciones parciales de ácidos grasos en triglicéridos de pulmón de conejas control (A) y gestantes (B). Los triglicéridos de pulmón de conejas control muestran la misma especificidad general que los triglicéridos de hígado. Sin embargo, los ácidos palmítico y oleico no están localizados tan preferentemente en las posiciones (1 + 3) y 2, respectivamente. La gestación modifica la distribución posicional de ácidos grasos en los triglicéridos de pulmón, provocando una menor especificidad en la localización relativa de los ácidos grasos en las posiciones (1 + 3) y 2. Esta tendencia a igualar la distribución de ácidos grasos entre las posiciones (1 + 3) y 2 se observa claramente en los triglicéridos del pulmón fetal (figura 19): esto hace que las distribuciones parciales de ácidos grasos sean muy similares en triglicéridos de hígado y pulmón fetales.

La comparación de todos estos cambios en la distribución parcial de ácidos grasos en triglicéridos de hígado y pulmón de conejos adultos y fetos permite deducir algunas tendencias de tipo general. La gestación induce cambios en la distribución parcial de ácidos grasos de tri

glicéridos de ambos órganos. Estos cambios, sin embargo, se producen de forma opuesta, de modo que las diferencias de concentraciones de los ácidos grasos localizados en las posiciones (1 + 3) y 2 se elevan en hígado y disminuyen en pulmón de las conejas gestantes (figuras 17 y 18). Sin embargo, las distribuciones parciales de los triglicéridos fetales de hígado y pulmón son muy similares entre sí (figura 19); también se observa una gran similitud entre las distribuciones parciales de ácidos grasos de triglicéridos de pulmón materno y fetal.

3.5. EXPERIENCIAS DE INCORPORACION DE PRECURSORES RADIOACTIVOS EN DISTINTAS CLASES DE FOSFOLIPIDOS

Como ya se ha señalado en el apartado 2.7 los precursores utilizados fueron ácido 9, 10-³H-palmítico y L- α -glicerofosfato-¹⁴C. Para la elaboración de los resultados los valores experimentales de desintegración isotópica se han reducido a una actividad precursora igual para ambos isótopos (2.5×10^6 dpm/ mol de precursor). Asimismo se ha supuesto que las cantidades de ácidos grasos libres y glicerofosfato en fracción microsomal son despreciables y prácticamente no existe disolución isotópica.

En las figuras 20 a 26 se representan las cinéticas de incorporación de ácido palmítico y glicerofosfato en ácido fosfatídico de hígado y pulmón de madres y fetos de distintas edades de gestación, conejos recién nacidos, conejos de 5 días de edad y animales control. Se observa una buena correspondencia entre ambos isótopos, pues los valores de incorporación de palmítico son ligeramente superiores al doble de los de glicerofosfato, lo cual indica que prácticamente todo el ácido fosfatídico se sintetiza a partir de los precursores exógenos mediante la ruta "de novo".

En las figuras 20 A y 21 A se representan los valores correspon

dientes a hígado de madres de 21, 28 y 31 días de gestación. Se observa que a 21 días de gestación las incorporaciones son más bajas y la cinética más lenta que a 28 y 31 días, e incluso inferiores al control, (figs. 24 A y 25 A). Las cinéticas de 28 y 31 días son más rápidas que las de 21 días y el control y muestran niveles de incorporación muy superiores a ambos, llegando en algunos casos al doble del control. Los niveles de 28 días son, además, superiores a los de 31 días.

Estos datos guardan relación con los niveles de lípidos en plasma de madres gestantes estudiados con anterioridad (Acebal et al., 1973). Según estos estudios, los triglicéridos sufren una elevación de sus niveles plasmáticos desde el comienzo de la gestación hasta los días 20-22 en que llegan a su máximo, disminuyendo hasta el día 26 en que alcanzan un mínimo, inferior a los niveles de animales no gestantes, y comenzando después una elevación hasta el final de la gestación. Por otro lado, los fosfolípidos disminuyen desde el principio de la gestación hasta el día 26 en que alcanzan un mínimo elevándose después hasta el final de la gestación.

A la vista de estos hechos, los niveles bajos de incorporación a 21 días y la cinética lenta no significarían una menor síntesis neta de ácido fosfatídico, sino una utilización más rápida de este para producir fundamentalmente triglicéridos, ya que la incorporación en fosfolípidos es baja (figuras 28 y sig.), de acuerdo con los niveles plasmáticos. Los elevados niveles de incorporación isotópica en ácido fosfatídico por microsomas de hígado de 28 días, cuando los niveles de triglicéridos y fosfolípidos plasmáticos alcanzan valores mínimos, significarían una acumulación de ácido fosfatídico debido a su baja utilización posterior. Los niveles ligeramente más bajos de incorporación de 31 días pueden ser debidos a que los glicéridos plasmáticos ya están saliendo de sus niveles mínimos y hay una mayor utilización

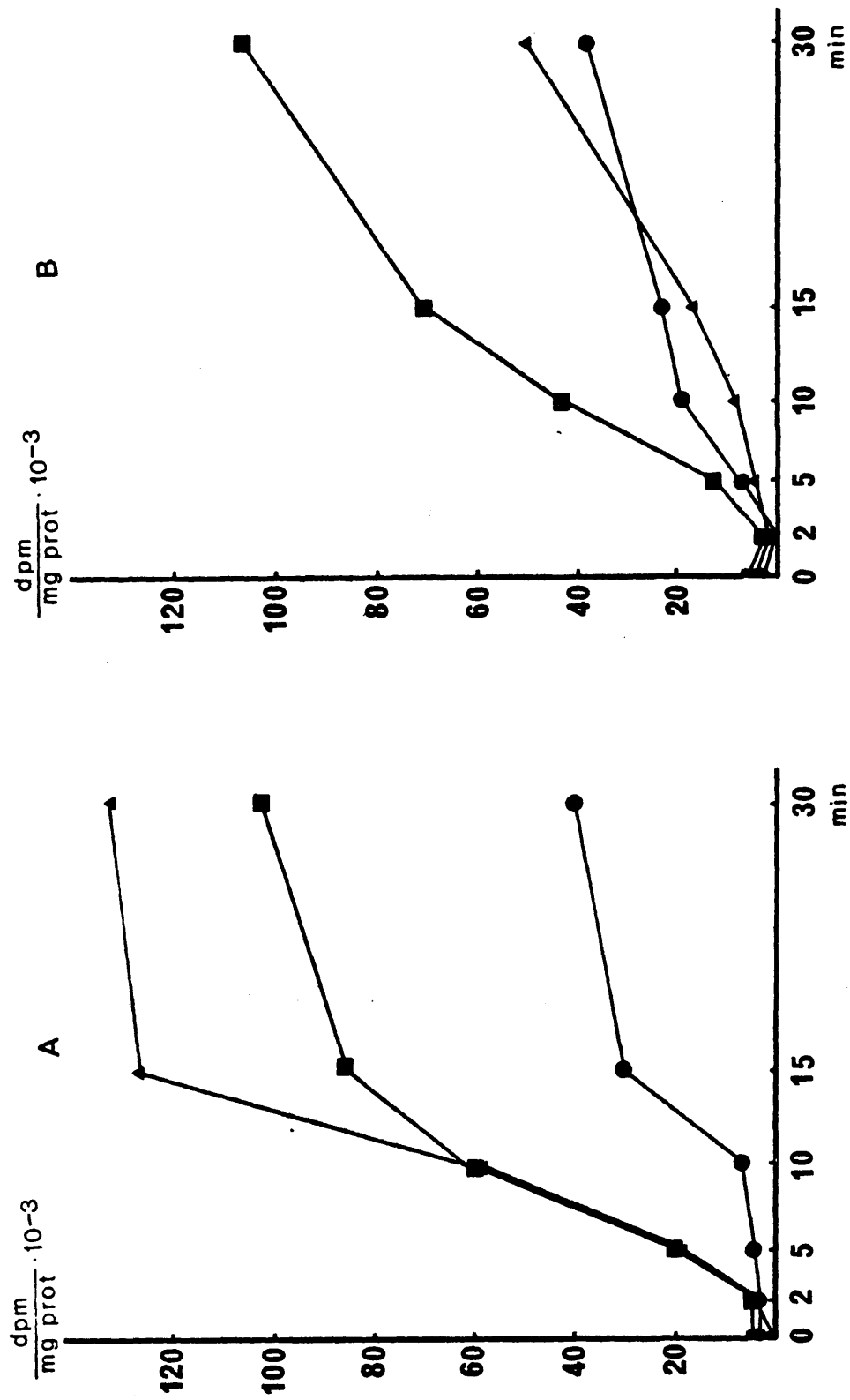


Fig. 20. Incorporación de ácido palmítico-³H en ácido fosfatídico de hígado de madres (A) y fetos (B) de 21 días (●—●), 28 días (▲—▲) y 31 días (■—■) de gestación.

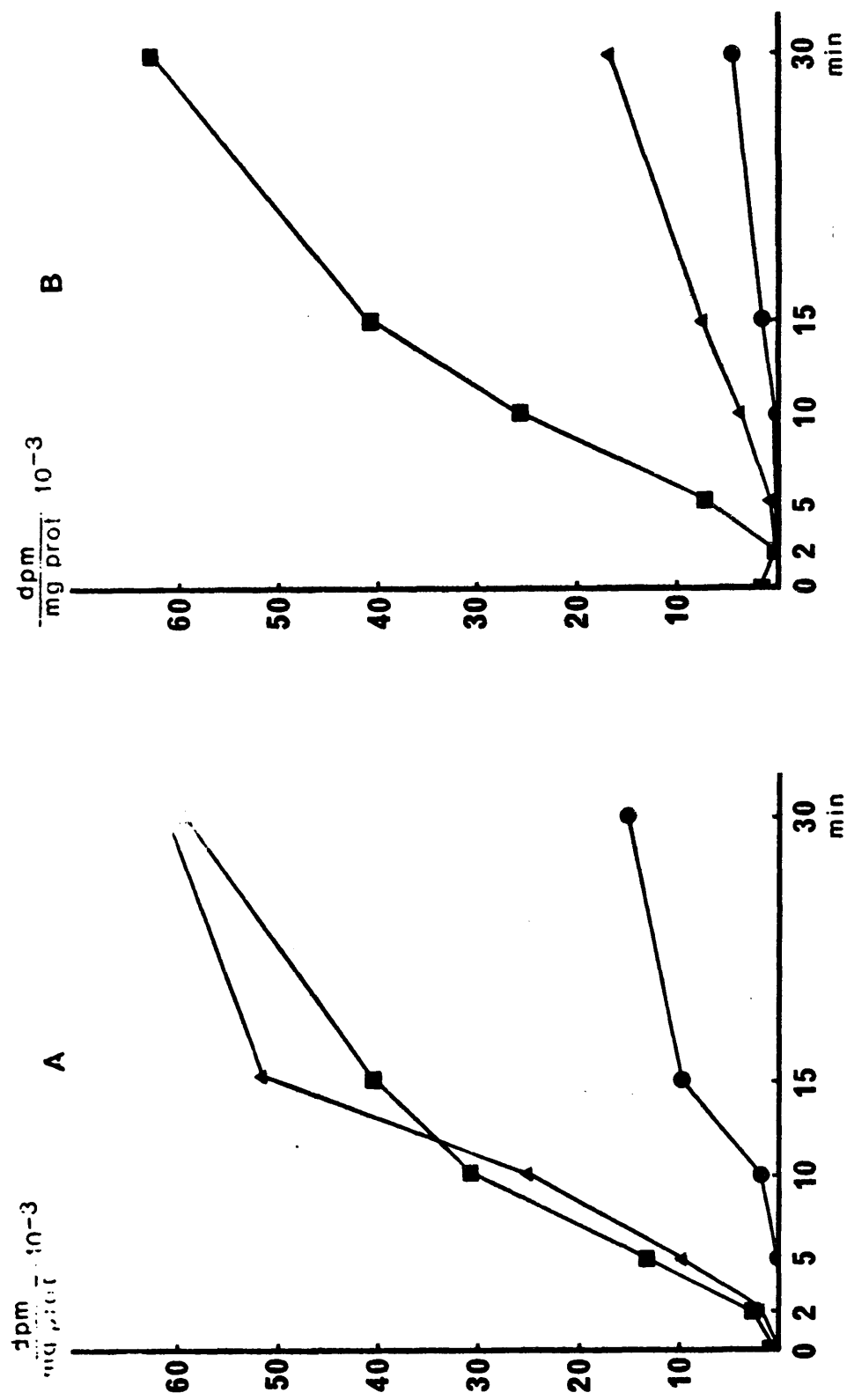
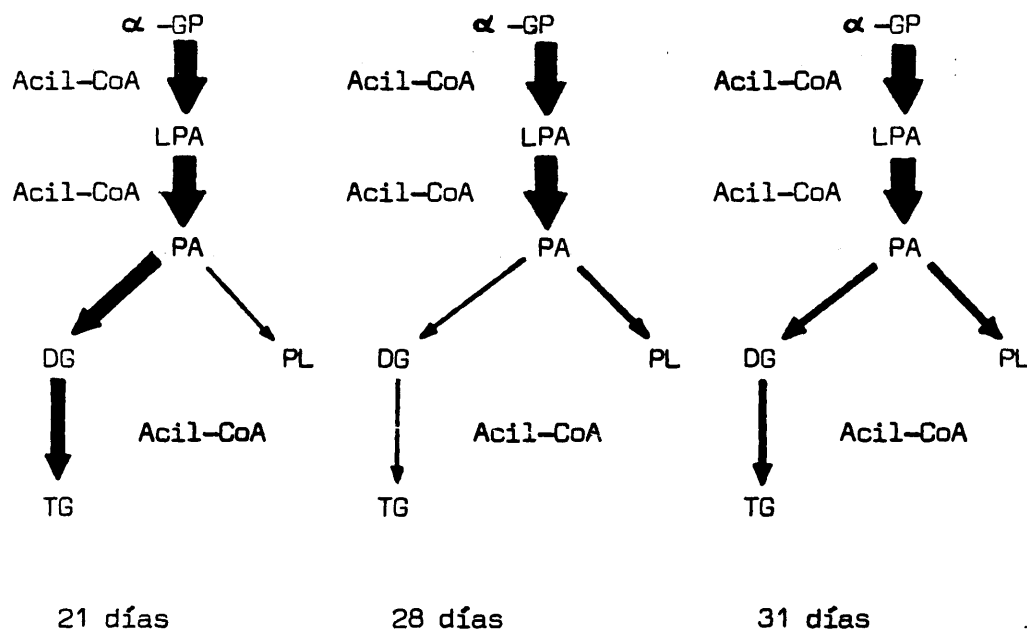


Fig. 21. Incorporación de glicernofosfato ^{14}C en ácido fosfatídico de mado de madres (A) y fetos (B).
 (Simbología como en la figura 20).

del ácido fosfatídico. En el esquema siguiente, en el que el grosor de las flechas indica los niveles que se dirigen por esa ruta, resumen estos aspectos discutidos anteriormente.



En las figuras 20 B y 21 B se representan las incorporaciones correspondientes a fracción microsomal de hígado de fetos de 21 y 28 días y conejos recién nacidos con una hora de vida.

Se puede observar que el hígado de fetos de 21 y 28 días incorpora niveles bajos en ácido fosfatídico, lo cual está de acuerdo con el hecho ampliamente documentado de que el hígado fetal tiene una actividad fisiológica muy baja antes del nacimiento, ya que no alcanza su ma

durez hasta las últimas etapas del desarrollo.

El hígado perinatal con una hora de actividad extrauterina - posee una actividad elevada que es igual al control, lo cual indica - que el órgano ha desarrollado su funcionalidad rápidamente, al tener que responder ya al metabolismo de un individuo independiente.

En las figuras 24 A y 25 A se representan los valores de incor - poración isotópica en ácido fosfatídico correspondientes a fracción - microsomal de hígado de conejos de 5 días de edad y animales control. Los conejos de 5 días han estado alimentados con leche materna "ad - libitum". Los niveles más elevados y la cinética más rápida de los - animales de 5 días respecto al control, e incluso respecto a madres - y fetos de otras edades, señalan la influencia dietética reguladora - sobre el comportamiento adaptativo de las enzimas del metabolismo li - pídico.

En las figuras 22 A y 23 A se representa la incorporación en - fracción microsomal de pulmón de madres de las edades de gestación ya indicadas. Las cinéticas de incorporación isotópica en ácido fosfatí - dico de pulmón son bastante más lentas que en hígado en todos los ca - sos; por otro lado, la incorporación en presencia de microsomas de - pulmón de madres de 28 días es mucho más rápida que las de 21 y 31 - días. Las diferencias con el control (figs. 24 B y 25 B) son muy pe - queñas, lo cual puede deberse a que el pulmón es un órgano que, con - exclusión hecha de la síntesis de fosfolípidos con actividad superfi - cial, tiene muy poca significación en el metabolismo lipídico general del organismo y por tanto, no debe verse tan afectado como el hígado por la gestación u otros estados metabólicos no normales.

La especial característica que supone la cinética de 28 días no parece sencilla de explicar en términos fisiológicos pues no hay ra - zón aparente para que el pulmón de madre de 28 días deba tener un com - portamiento esencialmente diferente del de las madres de 21 y 31 días.

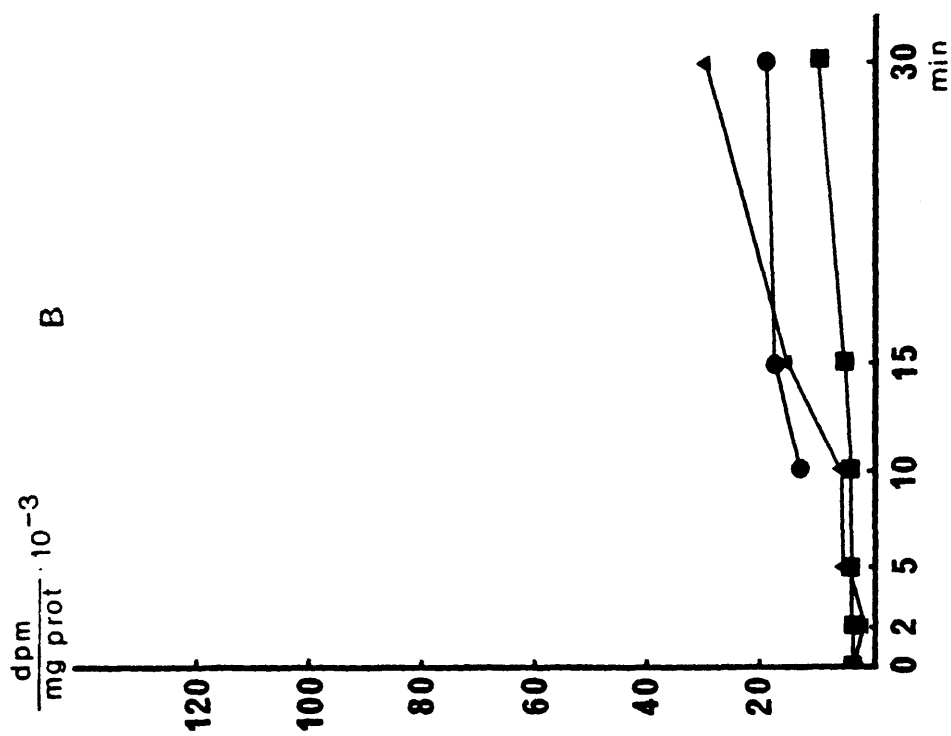
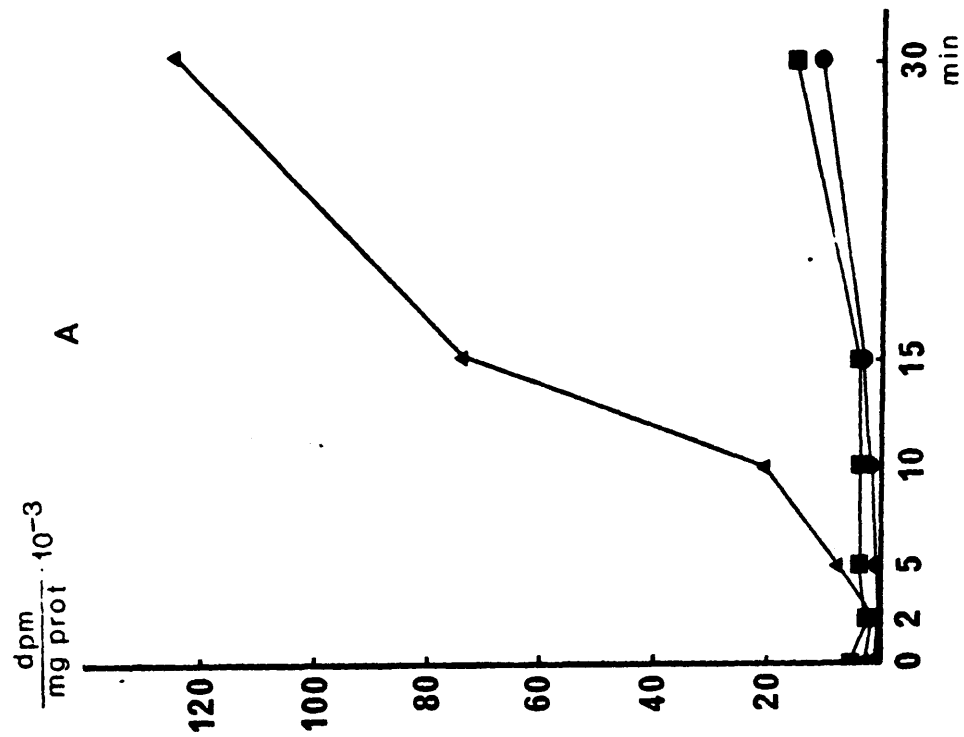


Fig. 22. Incorporación de ácido palmítico- ^3H en ácido fosfatídico de pulmón de madres (A) y fetos (B).
 Símbolos como en la figura 20.

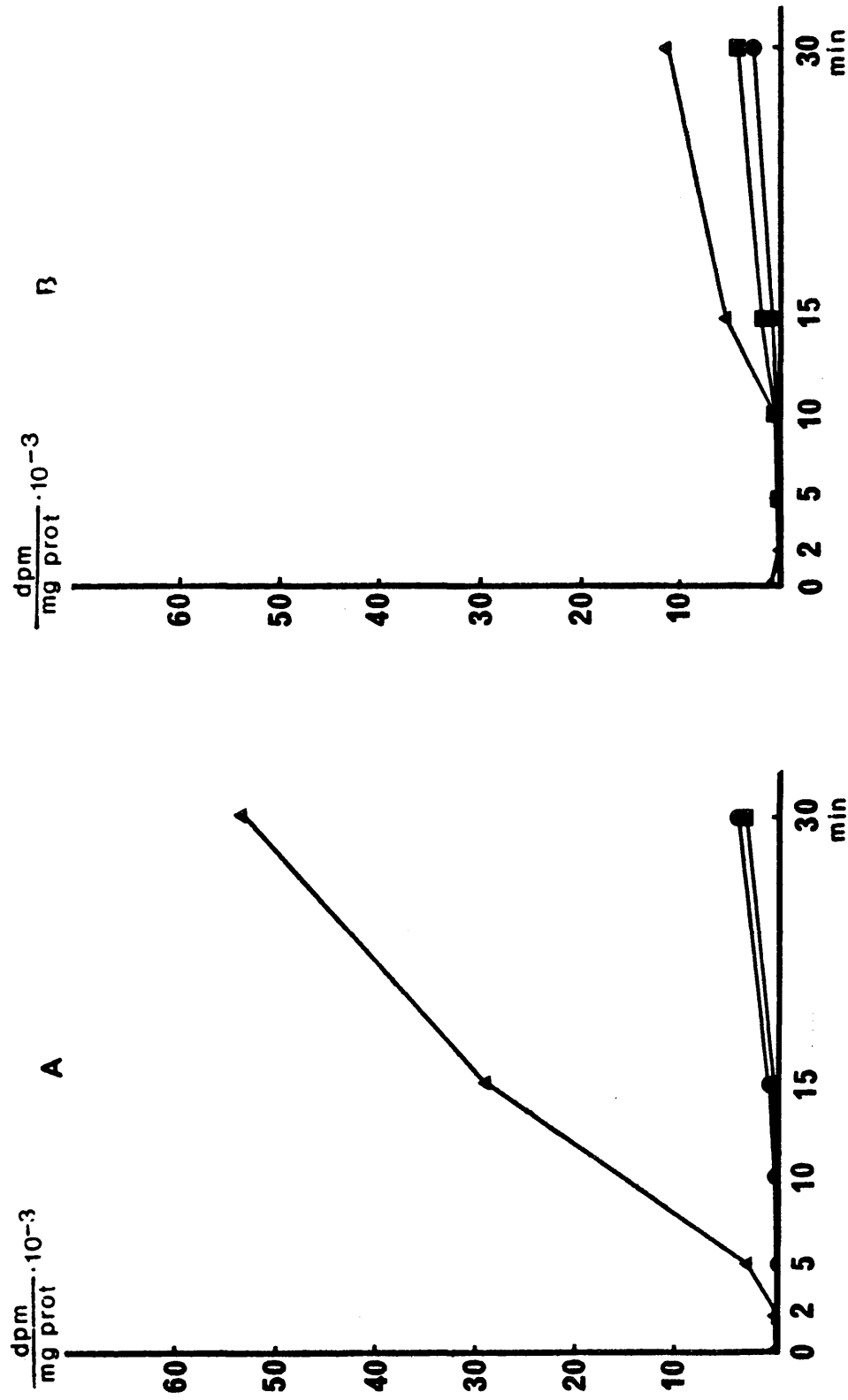


Fig. 23. Incorporación de glicerofosfato-¹⁴C en ácido fosfático de pulmón de madres (A) y fetos (B).
 Símbolos como en la figura 20.

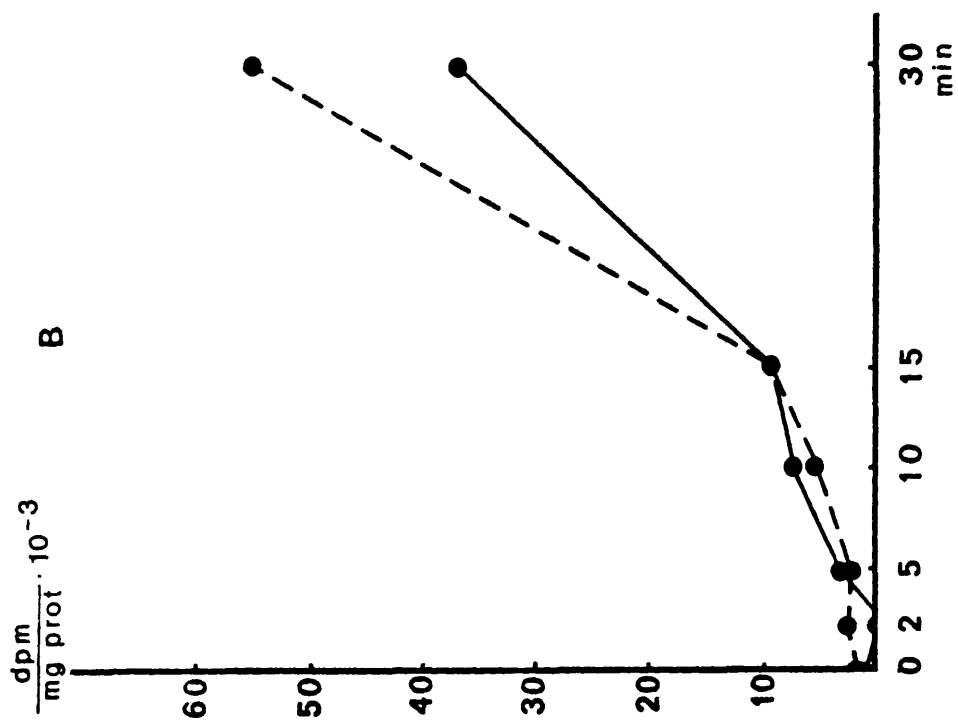
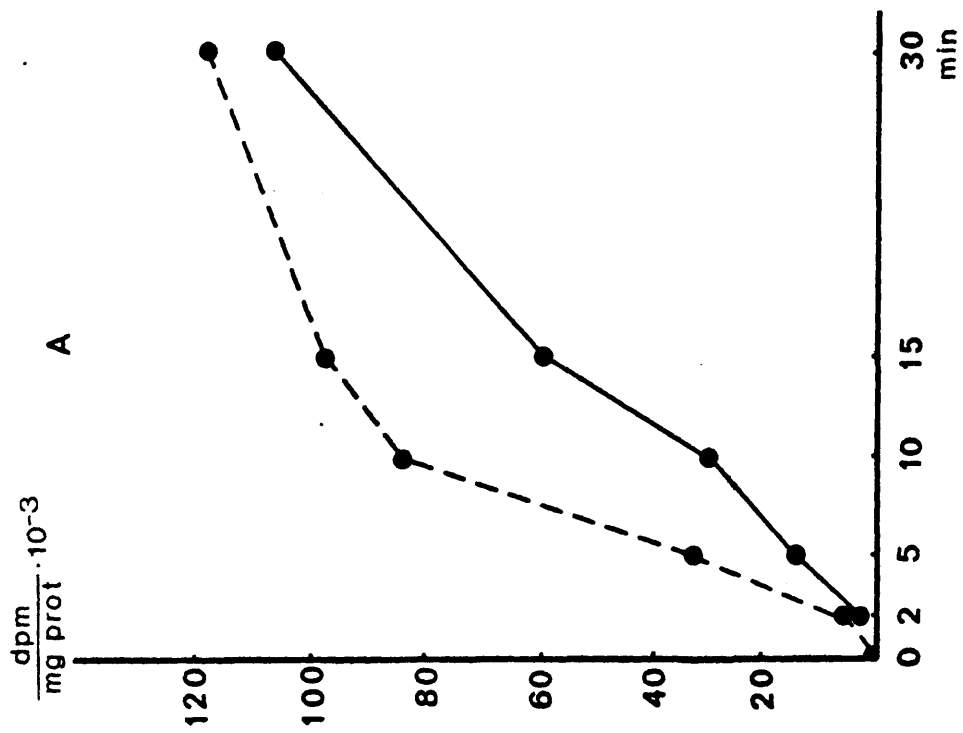


Fig. 24. Incorporación de ácido palmítico- ^3H en ácido fosfático de hígado (A) y pulmón (B) de gazapos de cinco días (---●---) y animales control (—●—).

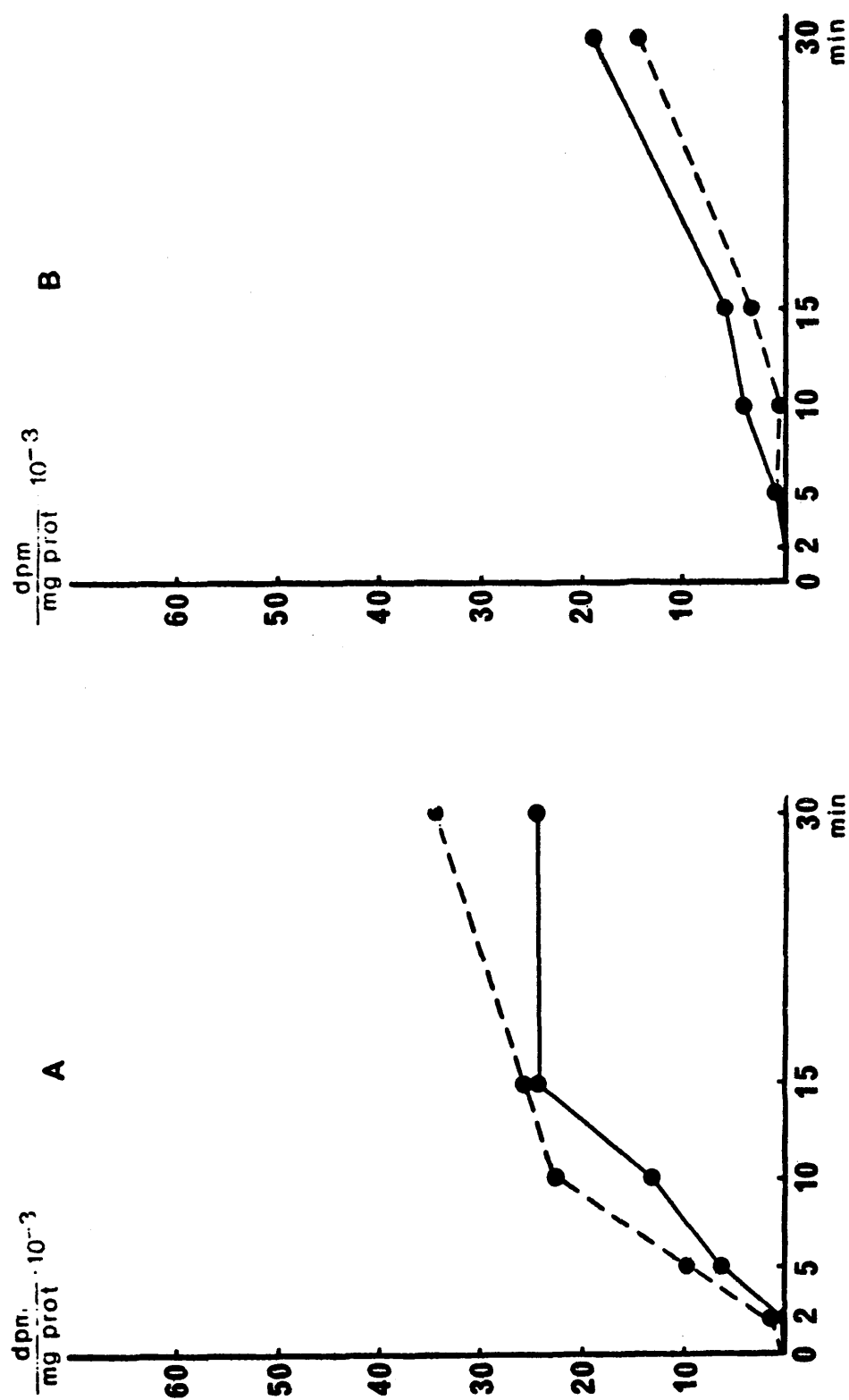


Fig. 25. Incorporación de glicerofosfato- ^{14}C en ácido fosfatídico de hígado (A) y pulmón (B) de gazapos, animal control. Símbolos como en la figura 24.

o el control. Sin embargo, se debe señalar que la edad de 28-29 días es crítica en el desarrollo fetal del conejo, pues es la fecha en la que los embriones comienzan a ser totalmente viables siendo posible que esto provoque alteraciones metabólicas en la unidad fetoplacentaria y sus relaciones maternas.

Otro hecho que se observa es que en general los niveles de incorporación isotópica, por microsomas de pulmón son inferiores a los de hígado. Esto confirma lo señalado anteriormente respecto de la mayor independencia metabólica del pulmón con relación al metabolismo lipídico general.

En las figuras 22 B y 23 B vemos las incorporaciones isotópicas correspondientes a fracción microsomal de pulmón de fetos y conejos recién nacidos de las edades ya descritas. Las cinéticas son también en este caso más lentas que en hígado, pero sin embargo, son más rápidas, y con niveles de incorporación más altos, que el pulmón materno excepto para 28 días.

Los fetos de 21 días no sintetizan activamente hasta 10 min. de incubación, estabilizándose rápidamente y no observándose la presencia de ácido fosfatídico en las cromatografías a tiempos inferiores. El pulmón de fetos de 28 días tiene un nivel de incorporación superior al de 21 días y el de 31 días es el que menos incorporación muestra.

Estos hechos están de acuerdo con los expuestos por Gluck (1967a) según los cuales los fetos acumulan grandes cantidades de fosfolípidos en pulmón hacia el día 31 de gestación y la síntesis es tanto más activa cuanto más próximo esté el día 31. Según Gluck, en el momento del nacimiento se liberan grandes cantidades de fosfolípidos, especialmente fosfatidilcolina, a los espacios alveolares.

Esto justificaría los bajos niveles de síntesis observados en el pulmón de conejos recién nacidos, pues sólo llevan una hora respirando, y como el turnover de los fosfolípidos alveolares es de 12-14

horas no ha habido todavía necesidad de sintetizar el surfactante de recambio ya que está recién liberado.

En las figuras 24 B y 25 B se representan los niveles de incorporación isotópica en ácido fosfatídico por fracción microsomal de pulmón de conejos de 5 días de edad y animales control. Se observa que los conejos de 5 días incorporan prácticamente igual que el control y esto puede ser debido a que el pulmón es un órgano que completa su funcionalidad muy rápidamente, quizás en el plazo de pocos minutos, no debiendo, por tanto, existir grandes diferencias entre órganos procedentes de animales de edad variada si la fisiología respiratoria es normal.

Las figuras 26 y 27 representan como resumen los niveles de incorporación de ácido palmítico (^3H) y glicerofosfato (^{14}C) en ácido fosfatídico por microsomas de hígado y pulmón, tomando los tiempos más representativos según Tombropoulos (1973) que son 5 y 30 minutos. Se puede observar que los niveles de incorporación son mayores a tiempos de incubación de 30 min. y las variaciones observadas entre las distintas edades corresponden con la interpretación dada de los resultados obtenidos en las experiencias cinéticas de incorporación de precursores.

En las figuras 28 A, B y 29 se representan los niveles de incorporación de ácido palmítico- ^3H en distintas clases de fosfolípidos por hígado de madres, fetos y animal control, comparando los niveles de incorporación de la fracción microsomal (28 A y 29 A) con el homogeneizado total (28 B y 29 B).

Se puede observar que, análogamente a como ocurre con el ácido fosfatídico, las incorporaciones son superiores a tiempos de incubación de 30 min. y que el homogeneizado total incorpora más que la fracción microsomal, hecho que está de acuerdo con datos publicados por otros autores según los cuales al añadir la fracción soluble a la

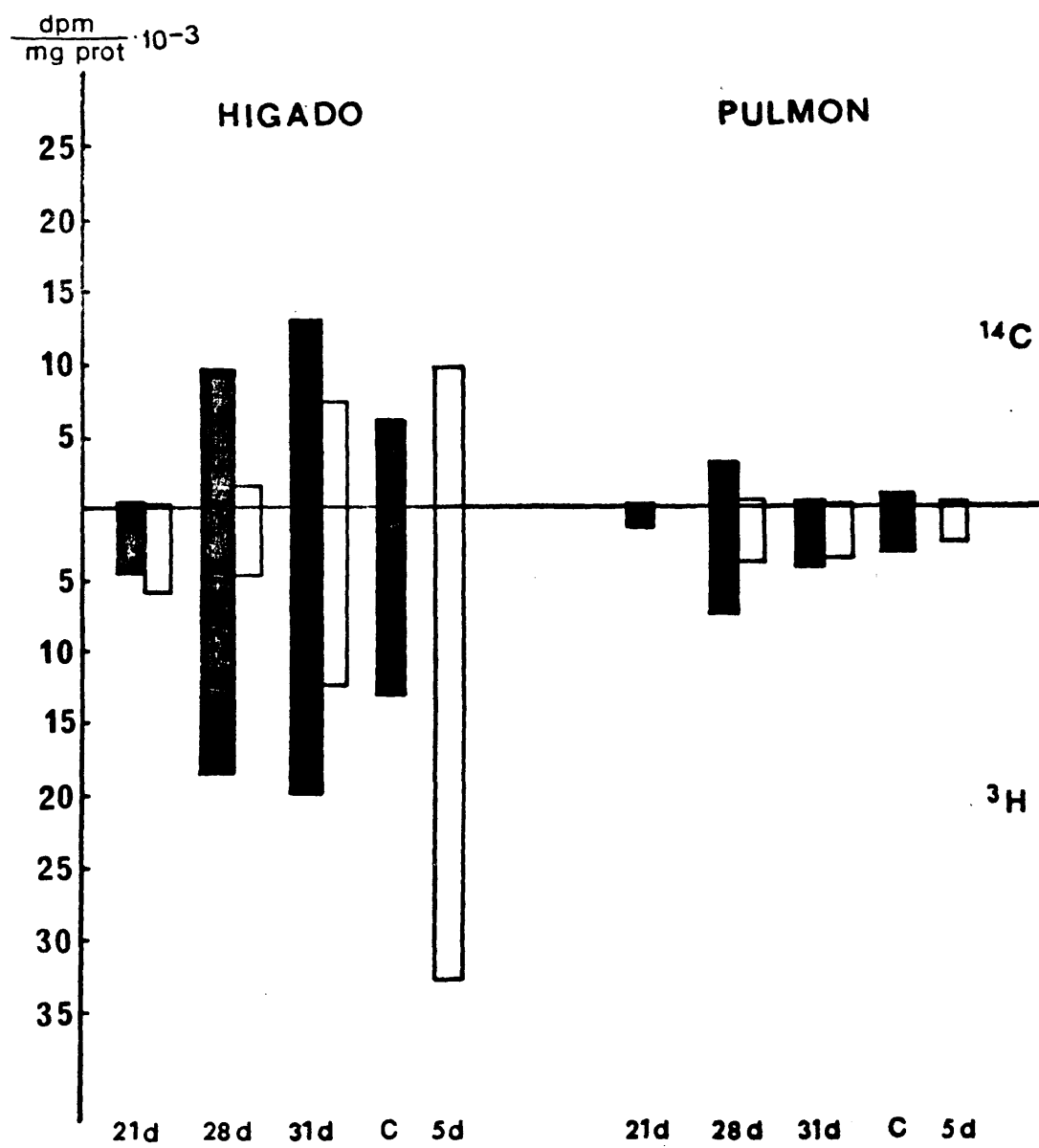


Fig. 26. Incorporación de ácido palmítico (³H) y glicerofosfato (¹⁴C) en ácido fosfatídico. Tiempo de incubación 5 min. Edades de gestación indicadas en la figura. (C) control; (5d) gazapos.

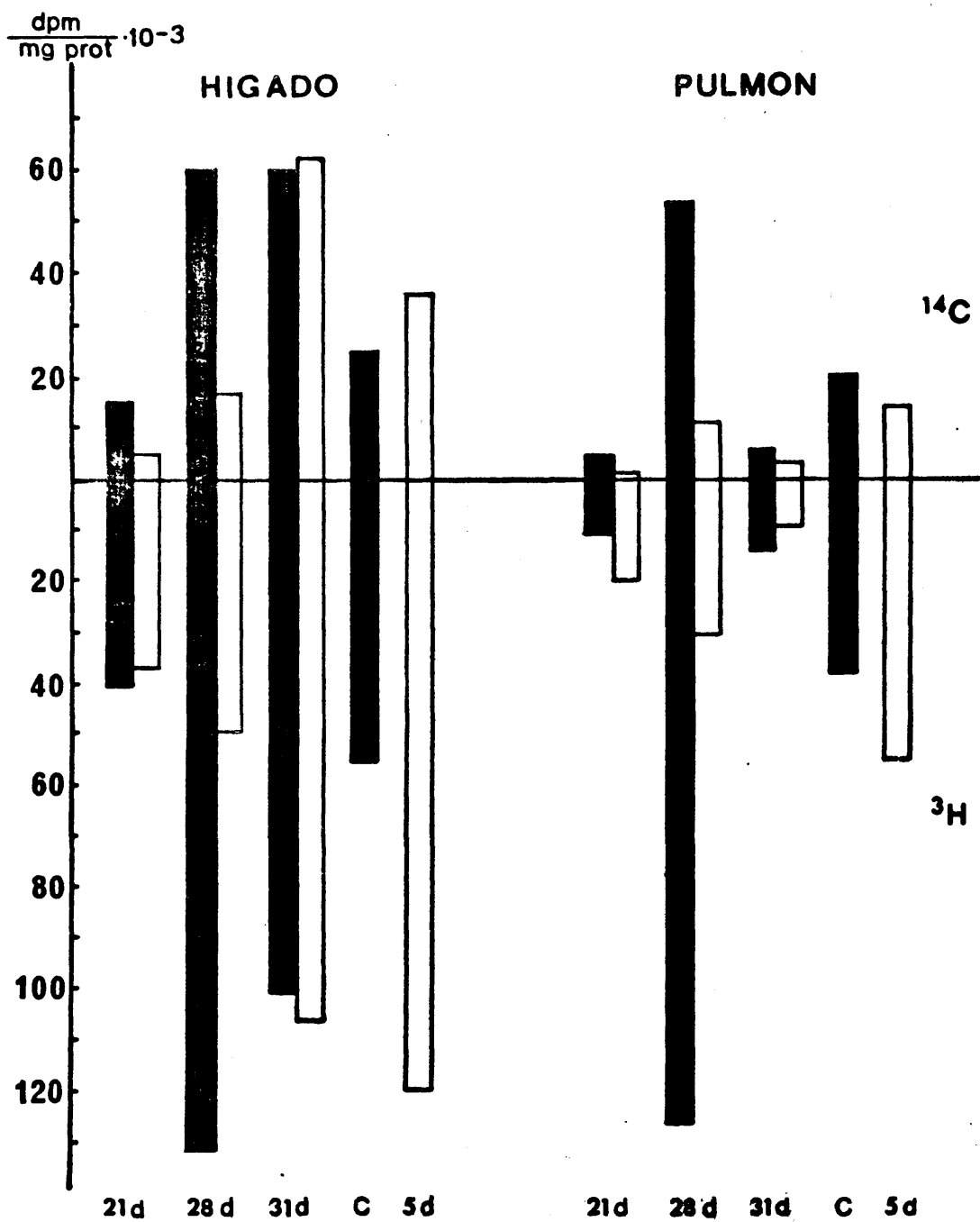


Fig. 27. Incorporación en ácido fosfatídico igual figura 26. Tiempo de incubación 30 min.

fracción microsomal se incrementan en gran medida los niveles de síntesis de fosfolípidos.

La lisolecitina y la lecitina son los fosfolípidos que muestran mayor variación con la edad de gestación, lo cual es concordante con resultados de trabajos previos (Acebal et al., 1973) según los cuales la disminución de fosfolípidos plasmáticos a lo largo de la gestación afecta principalmente a estas dos clases y muy poco a la fosfatidiletanolamina.

Las figuras 28 C, D y 30 representan los niveles de incorporación de ácido palmítico-³H en distintas clases de fosfolípidos por pulmón de madres, fetos y animales control, comparando la fracción microsomal (28 C y 30 A) y el homogeneizado total (28 D y 30 B).

Se comprueba que análogamente al hígado el homogeneizado total es el que incorpora más activamente a 30 min. correspondiendo a la fosfatidilcolina la máxima incorporación, como es de esperar, ya que ésta es el principal producto de la síntesis de fosfolípidos en pulmón, tanto en madres como en fetos y control.

La variación observada en la fosfatidilcolina en hígado y pulmón es consecuente con las cinéticas de incorporación en ácido fosfatídico expuestas anteriormente pues las madres y fetos de 28 días son los más activos seguidos del control y madres y fetos de 21 días. Sin embargo, la fosfatidiletanolamina no sufre grandes variaciones ni entre fracción microsomal y homogeneizado total, ni entre las diferentes edades de gestación y de control.

En las figuras 31 y 32 se comparan los niveles de incorporación de ácido palmítico-³H en distintas clases de fosfolípidos por fracción microsomal de hígado (31 a) y pulmón (31 B) a 5 min. de incubación, y las mismas (32 A y B) a 30 min. de incubación.

Se observa que en pulmón es la fosfatidilcolina el principal -

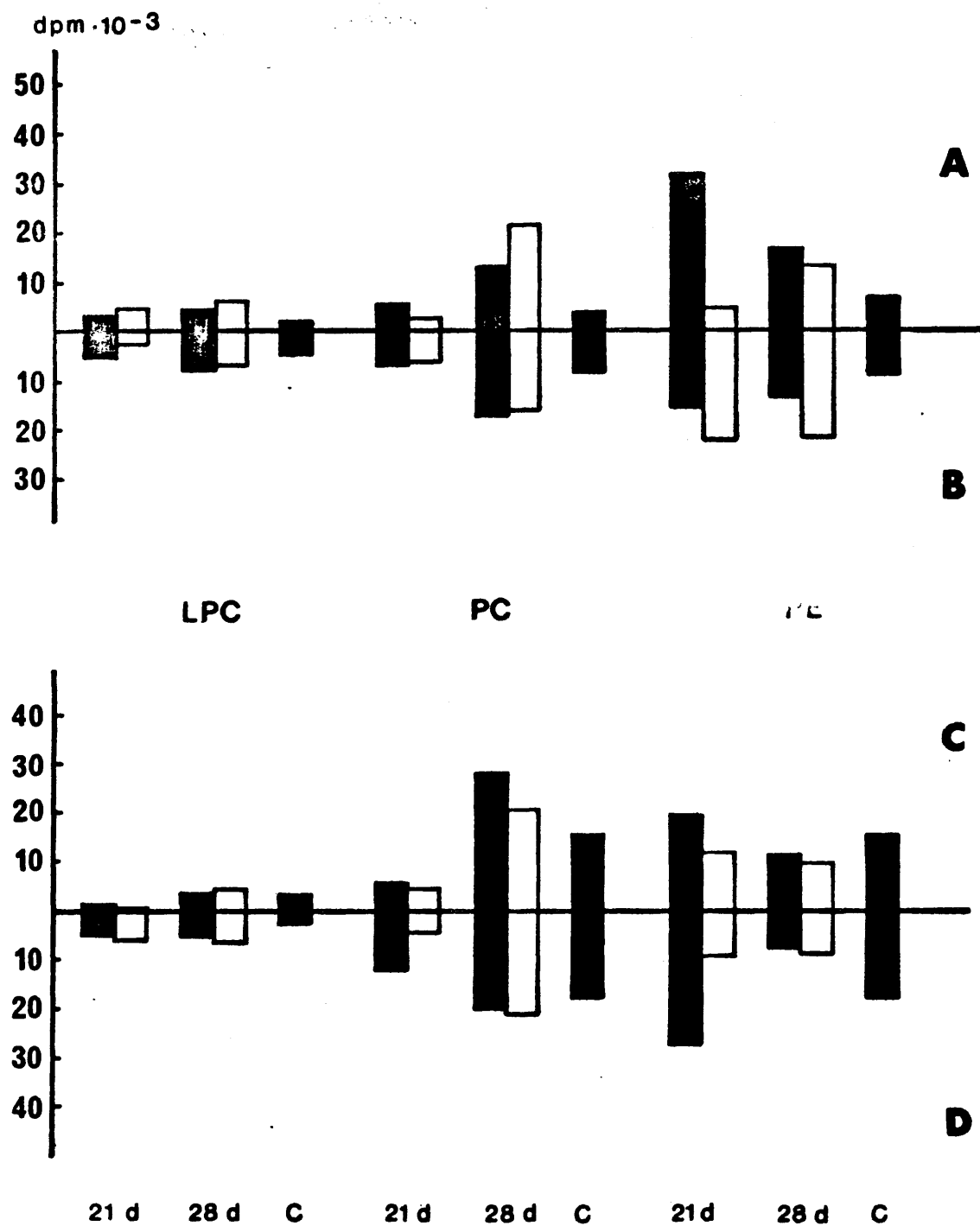


Fig. 28. Incorporación de palmítico-³H en distintas clases de fosfolípidos. (A) fracción microsomal de hígado; (B) homogeneizado total de hígado; (C) fracción microsomal de pulmón; (D) homogeneizado total de pulmón. Tiempo de incubación 5 min.

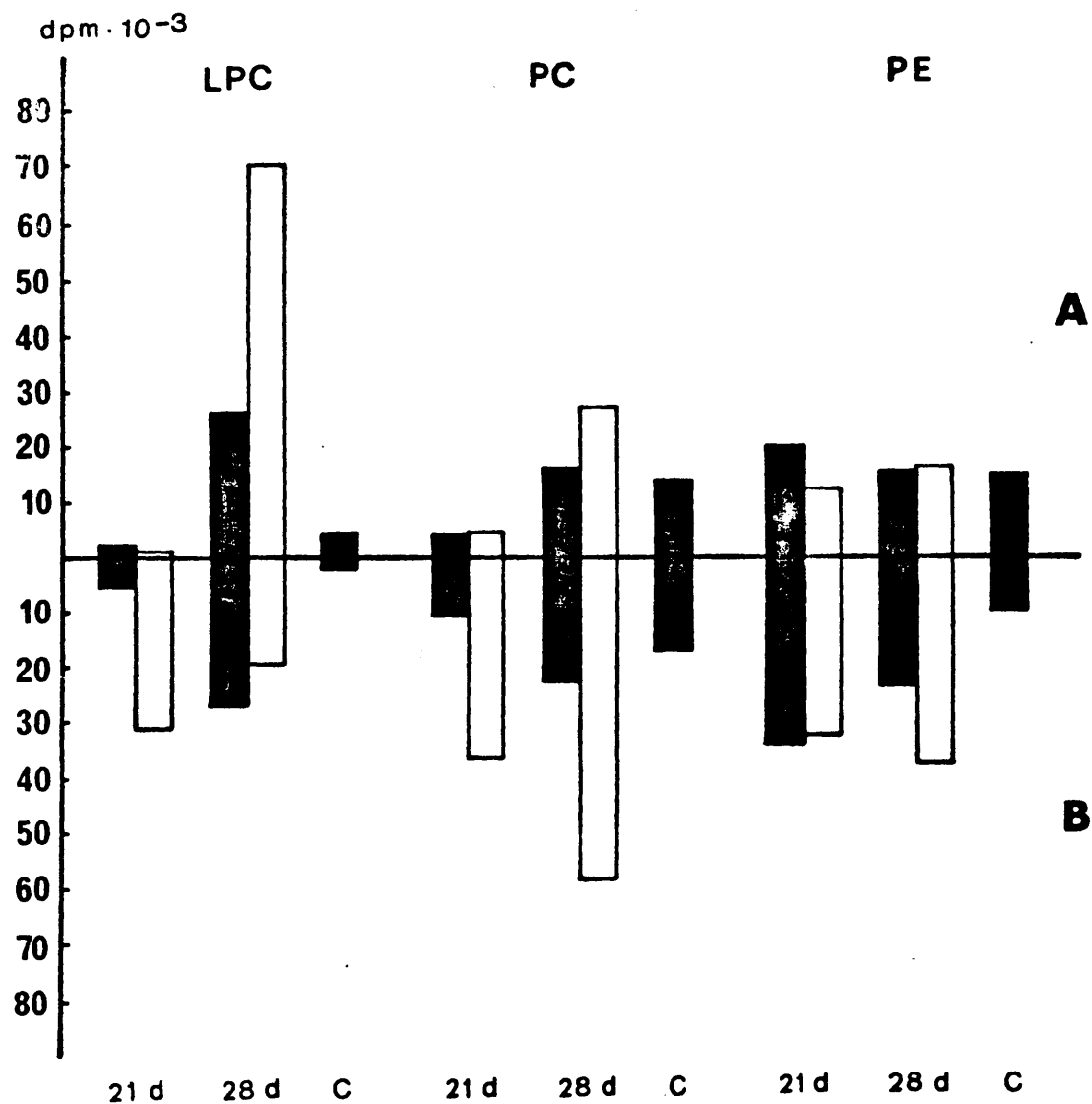


Fig. 29. Incorporación de ácido palmítico- ^3H en distintas clases de fosfolípidos. (A) fracción microsomal de hígado; (B) homogeneizado total de hígado. Tiempo de incubación 30 min.

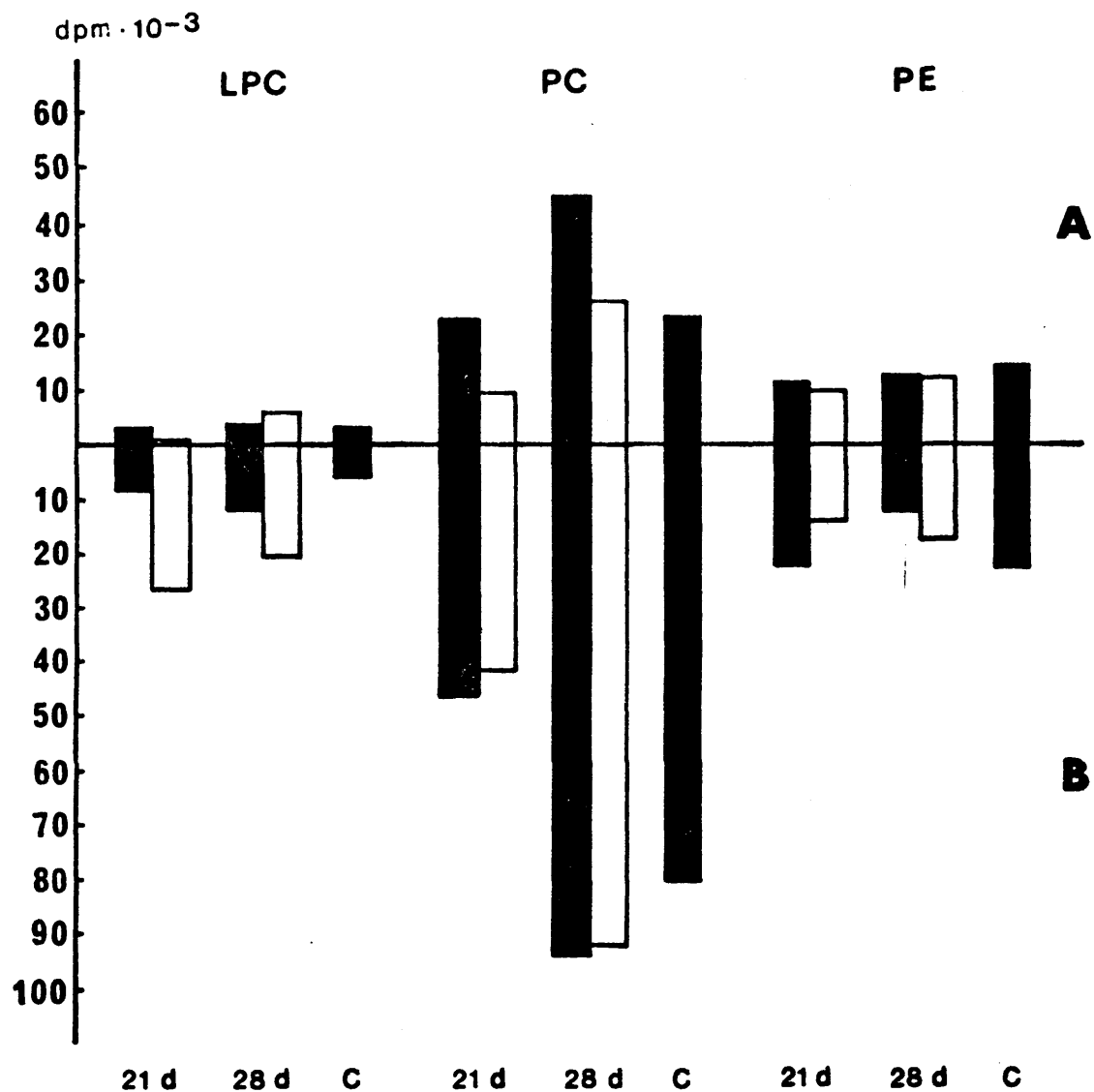


Fig. 30. Incorporación en distintas clases de fosfolípidos de ácido palmítico-³H. (A) fracción microsomal de pulmón; (B) homogeneizado total de pulmón. Tiempo de incubación 30 min.

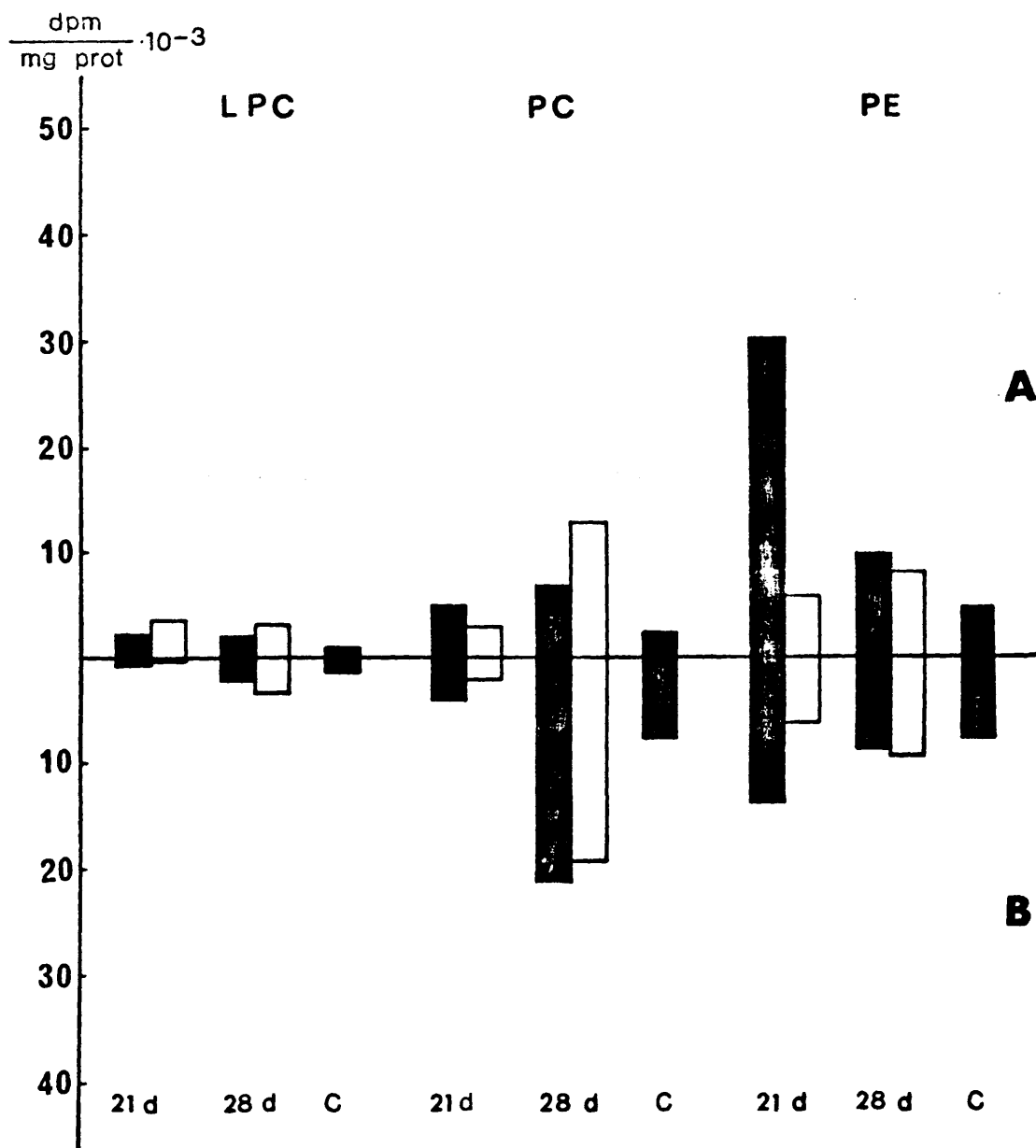


Fig. 31. Incorporación de ácido palmítico- ^3H en distintas clases de fosfolípidos. Comparación entre fracción microsomal de hígado (A) y pulmón (B). Tiempo de incubación 5 min.

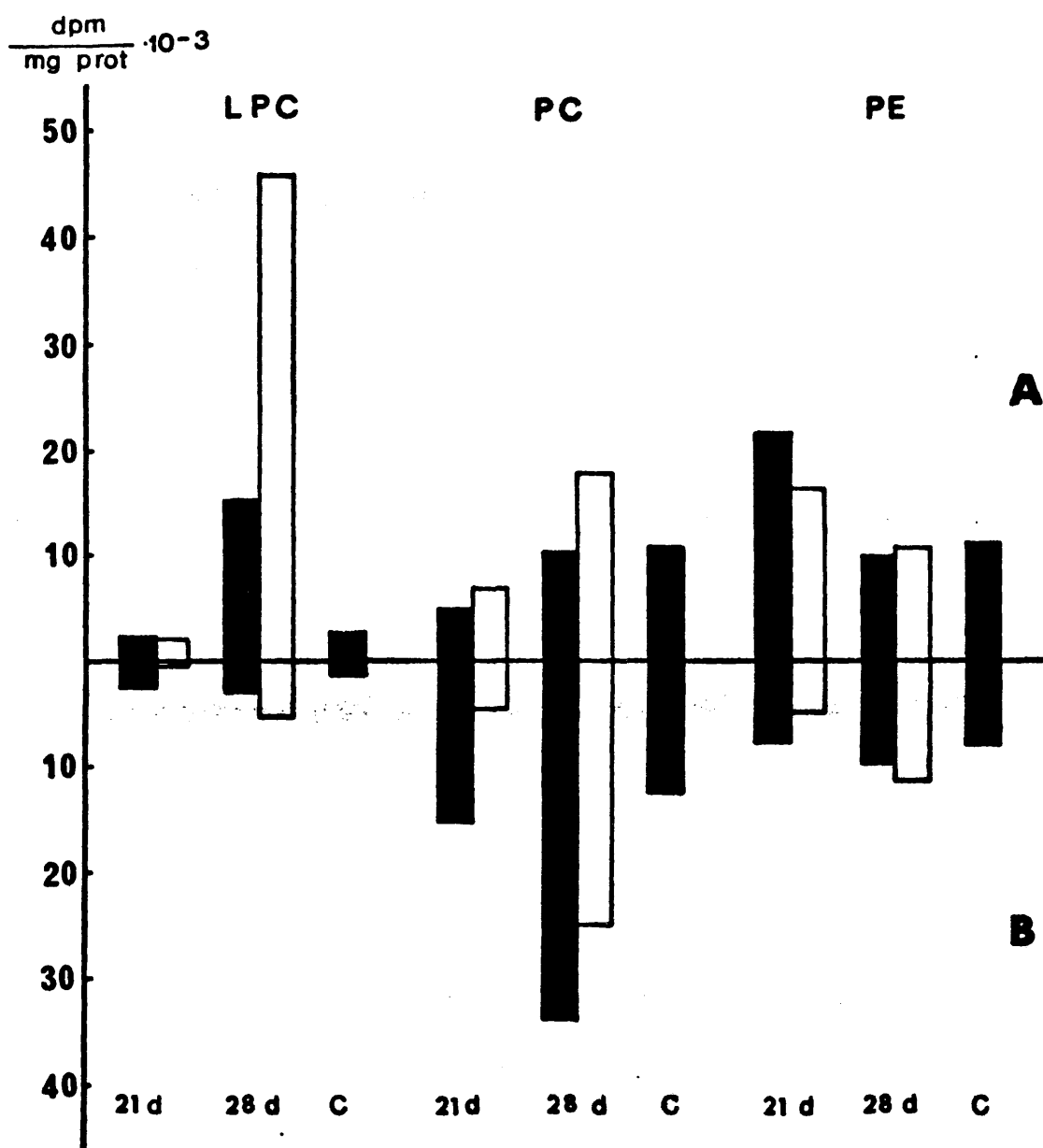


Fig. 32. Incorporación de ácido palmítico-³H en distintas clases de fosfolípidos. Comparación entre fracción microsomal de hígado (A), pulmón (B). Tiempo de incubación 30 min.

producto, mientras que en hígado hay menores diferencias entre fosfatidilcolina y etanolamina. Un hecho interesante de resaltar son los elevados niveles de incorporación en fosfatidiletanolamina en hígado de 21 días, que es consecuente con la disminución de fosfolípidos plasmáticos a lo largo de la gestación. Si la lisolecitina y la lecitina son los fosfolípidos que más disminuyen en plasma a lo largo de la gestación, es lógico que la mayor parte de la síntesis se oriente a la producción de fosfatidiletanolamina.

4. CONCLUSIONES

4. RESUMEN Y CONCLUSIONES

El objeto de los trabajos realizados acerca del metabolismo y composición de los lípidos en conejos, objeto de esta memoria, se puede resumir en los siguientes puntos:

- Características estructurales de los lípidos de hígado en conejos adultos control, tratados con insulina, gestantes, y fetos, desde el punto de vista cualitativo y cuantitativo de sus ácidos grasos constituyentes.
- Estudios sobre distribución posicional de ácidos grasos en fosfolípidos de hígado y pulmón en los mismos grupos de animales.
- Cinética de incorporación de palmitato-³H y glicerofosfato-¹⁴C en ácido fosfatídico en fracción microsomal de hígado y pulmón de conejos adultos control, gestantes, fetos y gazapos recién nacidos.
- Incorporación de palmitato-³H en distintas clases de fosfolípidos en fracción microsomal y homogeneizado total de hígado y pulmón de conejos adultos control, madres y fetos.

y de los resultados obtenidos en la investigación de estos puntos se establecen las conclusiones que a continuación se señalan:

- 1.- Del estudio de la composición de ácidos grasos de los lípidos hepáticos se deduce que la gestación induce cambios que se traducen fundamentalmente en un incremento relativo de ácido palmítico y una disminución de esteárico y linoleico; cambios que son debidos a las variaciones en la composición de ácidos grasos de triglicéridos y fosfolípidos; los triglicéridos son responsables de los cambios en las concentra

ciones relativas de los ácidos grasos saturados, mientras - que los fosfolípidos lo son del insaturado. En los animales adultos los ácidos grasos constituyentes de triglicéridos - son más saturados que los de los fosfolípidos.

2.- Los fosfolípidos de hígado fetal presentan un valor muy bajo del grado de insaturación, inferior al de los triglicéridos del mismo origen. Su característica principal es la baja proporción de ácidos grasos poliinsaturados linoleico y araquidónico. La composición de los triglicéridos del hígado fetal es mas similar a la de un adulto control que a la del hígado materno.

3.- El estudio de la distribución de ácidos grasos entre las posiciones 1 y 2 de fosfatidilcolina de hígado, muestra que - no se ve afectada por la gestación. Por otra parte, la relación de ácidos grasos saturados localizados en la posición 1 a los de la posición 2, es notablemente menor en hígado - fetal que en hígado materno.

En fosfatidilcolina de pulmón, la relación entre las posiciones de ácido palmítico presentes en la posición 1 a las de la posición 2 es menor que en hígado tanto en conejas gestantes como en controles. Esto puede interpretarse en relación a la presencia en pulmón de agentes activos de superficie que son, fundamentalmente, lecitinas que poseen palmítico en su posición 2 (dipalmitoil-lecitinas), cuya síntesis transcurre mediante un ciclo de desacilación-reacilación, - al contrario de las lecitinas hepáticas cuya síntesis transcurre primordialmente mediante un mecanismo "de novo".

4.- En cuanto a la distribución de ácido palmítico en fosfatidilcolina de hígado y pulmón de fetos a término es prácticamen

te idéntica en ambos tejidos y similar a la del pulmón adulto. Esto parece estar relacionado con el hecho de que el feto de conejo sintetiza al término de la gestación grandes - cantidades de dipalmitoil-lecitina que son liberadas a los espacios alveolares con el comienzo de la respiración.

5.- La distribución de ácidos grasos en fosfatidiletanolamina - de pulmón no se afecta por la gestación; sin embargo, en la de hígado se observa un descenso en la relación posición - 1/posición 2 para los saturados 16:0 y 18:0 y los insatura- dos 18:1 y 18:2, debido, respectivamente, a un aumento de - sus proporciones en la posición 2 y a un descenso en las de la posición 1. Por otra parte, de los resultados obtenidos en la distribución de ácido palmítico en fosfatidiletanola- mina de pulmón fetal se deduce el predominio de un mecanis- mo "de novo" en la biosíntesis de este fosfolípido, en lu- gar de una acilación del lisoderivado correspondiente, como ocurría en la fosfatidilcolina.

Es de destacar la presencia en fosfatidiletanolaminas de hígado y pulmón fetales de ácidos grasos insaturados de cade- na larga, localizados, exclusivamente, en la posición 2 de este fosfolípido.

6.- En hígado la gestación provoca una mayor especificidad en - la localización de ácido palmítico en la posición (1+3) y - de los ácidos insaturados oleico y linoleico en la posición 2 de los triglicéridos. En pulmón, sin embargo, la gesta- - ción induce una menor especificidad en la distribución par- cial de ácidos grasos en triglicéridos. Esta tendencia a - igualar la distribución de ácidos grasos entre ambas posi- ciones se manifiesta también en triglicéridos de pulmón fe- tal, cuya distribución parcial de ácidos grasos es muy simi

lar a la de los triglicéridos de hígado fetal y de pulmón - materno. Estos resultados ponen de manifiesto la existencia en hígado de un mecanismo de síntesis de triglicéridos que posee diferente especificidad respecto a sus ácidos grasos constituyentes.

7.- En ningún caso la insulina, en las condiciones de experimen tación, indujo cambios ni en la composición de ácidos gra- sos de lípidos de tejidos ni en la distribución posicional de los mismos en las diferentes fracciones lipídicas estu- diadas.

8.- La síntesis de ácido fosfatídico en microsomas de hígado ma terno es consecuente con la variación que experimentan los glicerolípidos plasmáticos durante la gestación.

Los fosfolípidos exhiben unos niveles de incorporación que también son consecuentes con los datos de niveles plasmáti- cos de las distintas clases a lo largo de la gestación, - pues la lecitina y su lisoderivado son los más afectados - por la edad de gestación mientras que la fosfatidiletanola- mina no sufre grandes variaciones. Este último fosfolípido es, además, el producto principal de la síntesis cuando los niveles de síntesis de fosfolípidos son bajos, mientras que cuando comienzan a salir del mínimo la lecitina recupera - sus niveles de síntesis, generalmente superiores a los de - la fosfatidiletanolamina.

9.- Los niveles de incorporación de los precursores marcados en microsomas de hígado fetal y perinatal confirman que el hí- gado fetal tiene muy poca actividad fisiológica hasta el mo mento del nacimiento y que una vez comenzada la vida extra- uterina se alcanzan rápidamente niveles elevados de activi- dad biosintética.

Los animales de 5 días de edad exhiben niveles de síntesis muy elevados que señalan la influencia de la dieta en el comportamiento de las enzimas del metabolismo de lípidos.

- 10.- La síntesis de ácido fosfatídico en fracción microsomal de pulmón materno indica la mayor independencia metabólica de este órgano respecto al metabolismo lipídico general. Los niveles excepcionalmente elevados de síntesis a la edad de 28 días de gestación pueden explicarse en función de alteraciones de la unidad fetoplacentaria y su relación con la madre debido a ser la edad crítica en el desarrollo fetal, cuando los fetos son viables en caso de nacimiento prematuro.

Los niveles de síntesis de fosfolípidos son consecuentes con el hecho de que el pulmón sintetiza lecitinas como producto principal, ya que esta clase de fosfolípidos es la que compone, casi exclusivamente, el surfactante pulmonar.

- 11.- La actividad de la fracción microsomal de pulmón fetal en la síntesis de ácido fosfatídico y fosfolípidos, especialmente fosfatidilcolina, confirma datos de otros autores según los cuales el pulmón fetal acumula grandes cantidades de fosfolípidos hacia el final de la gestación con el fin de liberarlos a los espacios alveolares en el momento de iniciarse el proceso respiratorio. Análogamente al pulmón materno la fosfatidilcolina es el producto principal de esta actividad biosintética.

Los niveles de síntesis de ácido fosfatídico en conejos de 5 días de edad indican, al igualar al control, que ya se ha alcanzado completamente la madurez pulmonar. Esto confirmaría la ya señalada independencia metabólica del pulmón del resto del organismo al no existir diferencias en -

animales de edades muy diferentes cuando la fisiología respiratoria del pulmón es normal.

. 5. BIBLIOGRAFIA

5. BIBLIOGRAFIA

- AARKOG, D., "Clinical and citogenetics studies in hyposadias". Wilkins Symp., Baltimore, Maryland, 1969
- ABE, M., AKINO, T. y OHNO, K., Biochim. Biophys. Acta, 280, 275, (1972)
- ABE, M., AKINO, T., y OHNO, K., Tohoku J. Exp. Med., 109, 163, (1973)
- ABE, M., OHNO, K y SATO, R., Biochim. Biophys. Acta, 369, 36', (1974)
- ABRAHAM, S., Amer J. Clin. Nutr., 23, 1120, (1970)
- ACEBAL, C., ARCHE, R., CASTRO, J. y MUNICIO, A. M., Steroids Lipids Res., 4, 310, (1973)
- ADAM, P.A. J., TERRANO, K., RAIHA, N., Proc. 78th Annual Meeting of American Pediatric Society, Atlantic City, 1968
- AKESSON, B., Biochim. Biophys. Acta, 218, 57, (1970)
- AKESSON, B., ELOVSON, J., y ARVIDSON, G., Biochim. Biophys. Acta, 210, 15, (1970a)
- AKESSON, B., ELOVSON, J. y ARVICSON, G., Biochim. Biophys. Acta, 218, 44, (1970b)
- AKINO, T., ABE, M., y ARAI, T., Biochim. Biophys. Acta, 248, 274, (1971)
- ALCINCOR, L. G., INFANTE, R., SOLER-ARCILAGA, G., y POLONOWSKI, J., Biochim. Biophys. Acta 306, 347, (1973)
- ALEXANDER, D. P., BRITON, H. G., Foetal Anton Ciba Found. Symp., 95, (1968a) y J. Physiol., London, 196, 27, (1968b)
- ALLRED, J. B., ROEHING, K. L., J. Biol. Chem., 248, 4131, (1973)
- ARTOM, C., Fed. Proc., 27, 457, (1968)
- ARVIDSON, G. A. E., Eur. J. Biochem., 4, 475, (1968a)

- ARVIDSON, G. A. E., Eur. J. Biochem., 5, 415, (1968b)
- ASKIN, F. B., KUHN, C., Lab. Invest., 25, 260, (1971)
- BALINT, J. A., KYRIAKIDES, E. C., SPITZER, H. L. y MORRISON, E. S.,
J. Lipid Res., 6, 96, (1965)
- BALINT, J. A., BEELER, D. A., TREBLE, D. H. y SPITZER, H. L.,
J. Lipid Res., 8, 486, (1967)
- BASSET, J. J., Endocrinology, 50, 59, (1971)
- BARNES, C. G., Medical Disorders in Obstetric Practice, Ed. Blackwell
Oxford, 1965
- BENGTTSSON, L. P. y EJARKE, P. M., Acta Obstet. Gynec. Scan., 43, 49,
(1964)
- BENJAMIN, F. y GASPER, D. J., Am. J. Obst. Gyn., 94, 566, (1966)
- BEWSHER, P. D., TARRANT, M. E. y ASHMORE, J., Diabetes, 15, 346, (1966)
- BIEZENSKI, J. J., J. Lipid Res., 3, 120, (1962)
- BIEZENSKI, J. J. y KIMMEL, B., Proc. Soc. Exp. Biol., 130, 1238, (1969)
- BIEZENSKI, J. J., Am. J. Obstet. Gynec., 108, 638, (1970)
- BIEZENSKI, J. J., CARROZA, J. y LI, J., Biochim. Biophys Acta, 239,
92, (1971)
- BJERVE, K. S., FEBS Lett., 17, 14, (1971)
- BJERVE, K. S., Biochim. Biophys. Acta, 270, 348, (1972)
- BJERVE, K. S., Biochim. Biophys. Acta, 296, 549, (1973a)
- BJERVE, K. S., Biochim. Biophys. Acta, 306, 396, (1973b)
- BJORNSTAD, P. y BREMER, J., J. Lipid Res., 7, 38, (1966)
- BLEICHER, S. J., O'SULLIVAN, J. B. y FREINKEL, N., New Eng. J. Med.,
271, 866 (1974)

- BRANDT, A. E. y LANDS, W. E. M., Biochim. Biophys. Acta, 144, 605,
(1967)
- BREMER, J., GREENBERG, D. M., Biochim. Biophys. Acta, 46, 205, (1961)
- BRICKER, L. A., LEVEY, G. S., J. Biol. Chem., 247, 4914, (1972)
- BROCKERHOFF, H., Lipids, 6, 942, (1972)
- BRO-RASMUSSEN, BUUS, O., LUNDWALL, F., Acta Endoc., 40, 571, (1972)
- BRUMLEY, G. W., J. Clin. Invest., 46, 863, (1967)
- BUCKINGHAM, S., McNARY, W. F. Jr y SOMMERS, S. C., Science, 145,
1192, (1964)
- BUCKINGHAM, S., HEINEMANN, H. O., SOMMERS, S. C., y McNARY, W. F.,
Am. J. Path., 48, 1027, (1966)
- CAVALLI, D., Quad. Clin. Obst. Gin., 20, 427, (1966)
- CHANG, H. C., SEIDMAN, I., TEEBOR, G. y LANE, M. A., Biochem.
Biophys. Res. Commun., 28, 682, (1967)
- CHEVALIER, G. y COLLET, A., Anat. Rec., 174, 289, (1972)
- CHIDA, N., ADAMS, F. H., NOZAKI, M. y NORMAN, A., Proc. Soc. Exp.
Biol., N. Y., 122, 60, (1966)
- CLEMENTS, J. A., The Lung (A. A. Liebow. ed.) pp 31, Williams y
Wilkins, Baltimore, (1968)
- COLEMAN, M. H. y FULTON, W. C., "The Enzymes of Lipid Metabolism"
Edited by P. Desnuelle, pp 127-137, Fergamon Press,
N. Y., (1961)
- CSORBA, T. R., MATSUDA, I. y KALANT, N., Metab. Clin. Exptl., 15,
262, (1966)
- DAAE, L. N. W., Biochim. Biophys. Acta, 270, 23, (1972a)

DAAE, L. N. W., FEBS Lett., 27, 46, (1972b)

DAAE, L. N. W., Biochim. Biophys Acta, 306, 186, (1973)

DANNENBURG, W. N, BURT, R. L., y LEAKE, N. H., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 115, 504, (1964)

DANNENBURG, W. N. y BURT, R. L., Amer. J. Obst. Gyn., 92, 195, (1965)

DIAGUSTINE, R. P., Biochem. Biophys. Res. Commun., 43, 311, (1971)

DILS, R. R., y HUBSCHER, G., Biochim. Biophys. Acta, 46, 505, (1961)

DITTMER, J. C. y LESTER, R. L., J. Lipid. Res., 5, 126, (1964)

DOE, R. P., ZINNEMAN, H. M. y FLINK, E. B., J. Clin. Endocr. Metab. 20, 1484, (1960)

DRYDEN, F. D., MARCHELLO, J. A., FIGROIA, W. C. y HALE, W. H., J. Anim. Sci., 36, 19, (1973)

EFFROS, R. M., y CHINARD, F. P., J. Clin. Invest., 48, 1983, (1969)

ERBLAND, J. F. y MARINETTI, G. V., Fed. Proc., 21, 295, (1962)

ERBLAND, J. F. y MARINETTI, G. V., Biochim. Biophys. Acta, 106, 139, (1965)

FABIAN, E., STORK, A. y KUCEROVA, L., Amer. J. Obst. Gyn., 100, 904, (1968)

FAIRWEATHER, D. V. I., J. Obst. Gyn., Brit. Com., 78, 707, (1971)

FALLON, H. G., LAMB, R. y WALDELL, M. J., Int. Conf. Biochem. Lipids, 15th, p 62, (1972)

FELTS, J. M., Schweiz. Z. Tuberk. Pneum., 22, 89, (1965)

FERNANDEZ-SOUSA, J. M., MUNICIO, A. M. y RIBERA, A., Biochim. Biophys. Acta, 231, 527, (1971a)

FERNANDEZ-SOUSA, J. M., MUNICIO, A. M. y RIBERA, A., Biochim. Biophys. Acta, 248, 226, (1971b)

- FOLCH, J., J. Biol. Chem., 191, 807, (1951)
- FREINKEL, N., Diabetes, 13, 260, (1964)
- GAUTRAY, J. P., Reproduction Humaine, Ed. Masson et Cie, París, (1968)
- GEMZELL, C. A., FILTEJKERSKJOLD, F. y STROM, L., J. Clin. Endocr. Metabo., 15, 537, (1955)
- GIBSON, K. D., WILSON, J. D. y UDENFRIEND, S., J. Biol. Chem., 236, 673, (1961)
- GROSSBERG, J. L., Z. Ges. Exptl. Md., 139, 101, (1966)
- GLUCK, L., MOTOYAMA, E. K., SMITS, H. L. y KULOVICH, M. V., Pediat. Res. 1, 237, (1967a)
- GLUCK, L., SRIBNEY, M. y KULOVICH, M. V., Pediat. Res., 1, 247, (1967b)
- GLUCK, L., LANDOWNE, R. A. y KULOVICH, M. V., Pediat. Res., 4, 352, (1970)
- GLUCK, L., KULOVICH, M. V., EIDELMAN, A. I., CORDERO, L. y KHAZIN, A., Pediat. Res., 6, 81, (1972)
- GONÇALVES, J., FAVARGER, P. y ROUS, S., Biochimie, 54, 1049, (1972)
- HAJRA, A. K. y AGRANOFF, B. W., J. Biol. Chem., 242, 1074, (1967)
- HAFT, D. E., Am. J. Physiol., 213, 219, (1967)
- HARADA, N., J. Nutr., 93, 263, (1967)
- HILLMAN, V. R. Jr., MARGRAF, J. H. y SAID, S. I., Am. J. Physiol., 211, 855 (1966)
- HATAKEYAMA-SASAKI, H. y OHNO, K., Biochim. Biophys. Acta, 380, 486, (1975)
- HAMERKATE, F. y VAN DEENEN, L. L. M., Biochim. Biophys. Acta, 106, 78, (1966)

- HEINEMANN, H. O., Am. J. Physiol., 201, 607, (1961)
- HIGGINS, J. A. y GREEN, C., Biochem. J., 104, 26P (1967)
- HILL, E. E., HUSBANDS, D. R. y LANDS, W. E. M., J. Biol. Chem., 243, 4440, (1968)
- HOLMAN, R. T., Acta Chem. Scand., 17, 80, (1963)
- HOWARD, C. F. Jr. y LOWNSTEIN, J. M., J. Biol. Chem., 240, 4170, (1965)
- HUMMEL, L., SCHIRMEISTER, W. y ZIMMERMANN, T., Biol. Neonate, 24, 292, (1974a)
- HUMMEL, L., SCHIRMEISTER, W. y ZIMMERMANN, T., Biol. Neonate, 24, 298, (1974b)
- HUSBANDS, D. R. y LANDS, W. E. M., Biochim. Biophys. Acta, 202, 129, (1970)
- IRITANI, N., YAMASHITA, S. y NUMA, S. Comunicación personal. Datos no publicados (1974)
- ISRAEL, S. L., STROUP, P. E. y SELINGSON, H. T., Obst. Gyn., 14, 68, (1959)
- JANSEN, J. R., ZANETTI, M. E. y HUCHINSON, C. F., Biochem. J., 102, 870, (1967)
- JONES, D. P. y ARKY, R. A., Metab. Clin. Exptl., 14, 1287, (1966)
- JOSIMOVICH, J. B. y McLAREN, J. A., Endocrinology, 71, 209, (1962)
- JURAND, J. y OLIVER, M. F., Atherosclerosis, 11, 141, (1970)
- KANOH, H., Biochim. Biophys. Acta, 176, 756, (1969)
- KANOH, H. y OHNO, K., Biochim. Biophys. Acta, 306, 203, (1973a)
- KANOH, H. y OHNO, K., Biochim. Biophys. Acta, 326, 17, (1973b)

- KAPLAN, S. L. y GRUMBACH, M. M., J. Clin. Endocr. Metab., 24, 80,
(1964)
- KATZ, J., LANDAU, B. R. y BARTSCH, G. E., J. Biol. Chem., 241, 727,
(1966)
- KAUFER, J. N., J. Lipid. Res., 13, 468, (1972)
- KENNEDY, E. P., Fed. Proc., 20, 934, (1961)
- KOFFY-ABOAGYE, K., RUBINSTEIN, D. y BECK, J. C., Can. J. Biochem.,
51, 1581, (1973)
- KIKAWA, Y. y YONEDA, K., Ann. Meet. Am. Thorac. Soc., 1973
- KING, R. J. y CLEMENTS, J. A., Am. J. Physiol., 223, 707, (1972a)
- KING, R. J. y CLEMENTS, J. A., Am. J. Physiol., 223, 715, (1972b)
- KING, R. J. y CLEMENTS, J. A., Am. J. Physiol., 223, 727, (1972c)
- KLAUS, M. H., CLEMENTS, J. A. y HAVEL, R. J., Proc. Nat. Acad. Sci.,
USA, 47, 1858, (1961)
- KLAUS, M. H., REISS, O. K., TOOLEY, W. H., PIEL, C. y CLEMENTS, J. A.
Science, 137, 750, (1962)
- KLEVIT, H. D., Pediat. Clin. N. Amer., 13, 59, (1966)
- KNOPP, R. H., SANDEK, C. D. y ARKY, R. A., Endocrinology, 92, 984,
(1973)
- KOPCHINSKY, T., GRIES, F. A. y HERBERG, L., Horm. Met. Res., 2, 185,
(1970)
- KORNACKER, M. S. y LOWENSTEIN, J. M., Science, 144, 1027, (1964)
- LEBS, H. A., Biochim. Biophys. Acta, 4, 249, (1950)
- LANDS, W. E. y MERKL, I., J. Biol. Chem., 238, 898, (1963)
- LEWMAN, J. T., Pediatrics, 27, 150, (1961)

- LARON, Z., MANNHEIMER, S. y NIFZAN, M., Arch. Dis. Child., 42, 24,
(1967)
- LEONE, V., de LEONARDIS, A. y di PIERRO, A., Min. Gin., 10, 276,
(1958)
- LIND, T. y BILLEWIZ, W. Z., J. Obst. Gyn., Brit. Com., 80, 1033,
(1973)
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. y RANDALL, R. J., J. Biol.
Chem., 193, 265, (1951)
- MANGOLD, H. K., J. Amer. Oil. Chem. Soc., 38, 708, (1961)
- MANGOLD, H. K. y MALNIC, D. C., J. Amer. Oil Chem. Soc., 37, 383, (1961)
- MANNING, R. y BRINDLEY, D. N., Biochem. J., 130, 1003, (1972)
- MARGOLIS, S. y VAUGHAN, M., J. Biol. Chem., 237, 44, (1962)
- MARTIN, J. D., MILLS, I. H., Clin. Sci. 17, 137, (1968)
- MARTIN, D. B. y VAGELOS, P. R., Handbook of Physiology; sección 5:
Adipose Tissue. Baltimore, (1966)
- MASSARO, G. D. y MASSARO, D., Am. Rev. Resp. Dis., 105, 927, (1972)
- McBRIDE, O. W., J. Lipid Res., 5, 453, (1964)
- METCALFE, L. E. y SCHMITZ, A. A., Anal. Chem., 33, 363, (1961)
- MILKOVIC, S., MILKOVIC, K., SENCAR, I. y PAUNOVIC, J., "Progress in
Brain Research"; ed. by De Wied and Wijnen. Elsevier,
Amsterdam. Vol 32, p. 71, (1970)
- MILKOVIC, S., MILKOVIC, S., MILKOVIC, K. y PAUNOVIC, J., Endocrinology
92, 380, (1973)
- MONTFOORT, A., Tesis doctoral, Utrecht, 1970
- MOORE, J. H. y WILLIAMS, D. L., Biochim. Biophys. Acta, 70, 348,
(1963)

- MORGAN, T. E., Arch. Int., 127, 401, (1971)
- MORGAN, T. E., FENLEY, T. N. y FIALKOW, H., Biochim. Biophys. Acta, 106, 403, (1965)
- MORIYA, T. y KANO, H., Tohoku J. Exp. Med., 112, 241, (1974)
- MULLICK, S., BAGGA, O. y MULLICK, V., Amer. J. Obst. Gyn., 89, 766, (1964)
- MURPHY, B. E. P. y CLARK, S., Amer. J. Obst. Gyn., 118, 538, (1974)
- NESTEL, P. J., Metab. Clin. Exptl., 16, 1123, (1967)
- NOBLE, R. C., CHRISTIE, W. y MOORE, J. H., Sci. Food Agric., 22, 616, (1971a)
- NOBLE, R. C., STEELE, W. y MOORE, J. H., Lipids, 6, 26, (1971b)
- OHEA, E. K. y LEVEILLE, G. A., J. Nutr., 99, 338, (1969)
- OHNO, K., SHIMOJO, T., AKINO, T., ABE, M., HASEGAWA, H. y KANO, M., Proc. Jap. Conf. Biochem. Lipids, 16, 207, (1974)
- OHTA, M., HASEGAWA, H. y OHNO, K., Biochim. Biophys. Acta, 280, 552, (1972)
- OKUYAMA, H., KANDURA, T. y NOJIMA, S. N., J. Biochem. Tokyo, 61, 732, (1967)
- OKUYAMA, H., EIBL, H. y LANDS, W. E. M., Biochim. Biophys. Acta, 280, 552 (1971)
- ONTKO, J. A., J. Biol. Chem., 247, 1788, (1972)
- PEARLMAN, W. H., CREPY, O. y MURPHY, M., J. Clin. Endocr., 27, 1012, (1967)
- PENHOS, J. C., WU, C. H., LEMBERG, A., DAUNAS, J., BRODOFF, B., SODERO, A. y LEVINE, R., Metab. Clin. Exptl., 17, 246, (1968)

- PETERSON, R. R. y YOUNG, W. C., *Endocrinology*, 50, 218, (1952)
- PELEGER, R. C., ANDERSON, N. G. y SNYDER, F., *Biochemistry*, 7, 2826, (1968)
- PICARD, C., *Bull. Soc. Roy. Belge Gyn. Obst.*, 37, 277, (1967)
- POPJAK, G., *J. Physiol.*, 105, 236, (1946)
- POPJAK, G. y BECKMANS, M. L., *Biochem. J.*, 47, 233, (1950)
- POPJAK, G., *Cold Spring Harbor Sym. Quant. Biol.*, 19, 200, (1954)
- PORCELLATI, G., ARIENTI, G., PIROTTA, M. y GIORGINI, D., *J. Neurochem.* 18, 1395, (1971)
- POSSMAYER, F., SCHERPOF, G. L., DUBELMAN, T. M. A. R., VAN GOLDE, L. M. G. y VAN DEENEN, L. L. M., *Biochim. Biophys. Acta*, 176 95, (1969)
- QUINTO, P., BOTTIGLIONI, F. y ORLANDI, C., "Metabolismo Glicídico e Stato Puerperale", Ed. Capelli, Bologna, (1964)
- RANDLE, P. J., GARLAND, P. B. y NEWHOLME, E. A., *Am. N. Y. Acad. Sci.*, 131, 324, (1965)
- RANDLE, P. J., *Diabetologia*, 2, 237, (1966)
- ROBINSON, J. y NEWHOLME, E. A., *Biochem. J.*, 104, 2c, (1967)
- ROGERS, C. G., *J. Nutr.*, 101, 1547, (1971)
- ROGERS, C. G., *Nutr. Rep. Int.*, 5, 381, (1972)
- RONGSTAD, R. y KATZ, J., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 55, 1148, (1966)
- ROUX, J. F., *Metabolism*, 15, 856, (1966)
- ROUX, J. F. y MYERS, R. E., *Amer. J. Obst. Gyn.*, 118, 385, (1974)
- RUBENSTEIN, B. y RUBENSTEIN, D., *Can. J. Biochem.*, 44, 129, (1966)
- SALERNO, D. M. y BEELER, D. A., *Biochim. Biophys. Acta*, 326, 325, (1973)

- SANCHEZ DE JIMENEZ, E. y CLELAND, V. W., *Biochim. Biophys. Acta*, 176, 685, (1969)
- SANDBERG, A. A. y SLAUNWHITE, W. R., *J. Clin. Invest.*, 38, 1290, (1965)
- SCARPELLI, E. M., *Bull. N. Y. Acad. Med.*, 44, 431, (1968)
- SCARPELLI, E. M., CLUTARIO, B. C. y TAYLOR, F. A., *J. Appl. Physiol.*, 23, 880, (1967)
- SCARPELLI, E. M., CHANG, S. L. y COLACICCO, G., *Am. Rev. Resp. Disc.*, 102, 285, (1970)
- SEIDMAN, I., HORLAND, A. A. y TEEBOR, G. W., *Biochim. Biophys. Acta*, 146, 600, (1967)
- SHEPHERD, D., YATES, D. W. y GARLAND, P. B., *Biochem. J.*, 98, 3c, (1966)
- SINCLAIR, A. J., *Can. J. Biochem.*, 49, 700, (1971)
- SPELLACY, W. M., GOETZ, I. C. y GREENBERG, B. Z., *Amer. J. Obst. Gyn.*, 90, 753, (1964)
- SPOTO, P., *Atti. Soc. It. Ost. Gyn.*, 49, (1962)
- STEIN, J. M., REDDING, R. A., HANCK, C. T. y Stein, M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 34, 434, (1969)
- SUNDLER, R., ARVIDSON, G. y AKESSON, B., *Biochim. Biophys. Acta*, 280, 559, (1972)
- SUNDLER, R., AKESSON, B. y NILSSON, A., *Biochim. Biophys. Acta*, 337, 248, (1974)
- SUNDLER, R., AKESSON, B. y NILSSON, A., *FEBS Letters*, 43, 303, (1974)
- SWEENEY, M. J. y ASHMORE, J., *Metab. Clin. Exptl.*, 14, 516, (1966)
- SWELL, L., ENTENMAN, C., LEONG, G. F. y HOLLOWAY, R. J., *Am. J. Physiol.*, 215, 1390, (1968)

- TAKAYASU, K., TADA, T., OKADA, F. y YOSHIKAMA, I., Jap. Circul. J., 35, 1059, (1971)
- TAMAI, Y., Fed. Proc., Fed. Amer. Soc. Exp. Biol., 31, 438, (1972)
- TIERNEY, D. F. y JOHNSON, R. P., J. Appl. Physiol., 20, 1253, (1966)
- TIERNEY, D. F., CLEMENTS, J. A. y TRAHAN, H. J., Am. J. Physiol., 213, 671, (1967)
- TOMBROPOULOS, E. G., Arch. Biochem. Biophys., 158, 911, (1973)
- TOSHIMA, N., AKINO, T. y OHNO, K., Tohoku J. Exp. Med., 108, 265, (1972)
- TREBLE, D. H., FRUMKIN, S., BALINT, J. A. y BEELER, D. A., Biochim. Biophys. Acta, 202, 163, (1970)
- TREWHELLA, M. A. y COLLINS, F. D., Biochim. Biophys. Acta, 296, 34, (1973a)
- TREWHELLA, M. A. y COLLINS, F. D., Biochim. Biophys. Acta, 296, 51, (1973b)
- VAN DER BOSCH, H., BONTE, H. A. y VAN DEENEN, L. L. M., Biochim. Biophys. Acta, 98, 648, (1965)
- VAN DUYNE, C. M., Proc. Soc. Exp. Med., 102, 599, (1959)
- VAN DUYNE, C. M., Amer. J. Obst. Gyn., 84, 1069, (1962)
- VAN GOLDE, L. M. G., Tesis doctoral, Utrecht, 1968
- VAN GOLDE, L. M. G., SHERPHOF, G. L. y VAN DEENEN, L. L. M., Biochim. Biophys. Acta, 125, 496, (1966)
- VAN GOLDE, L. M. G., SHERPHOF, G. L. y VAN DEENEN, L. L. M., Biochim. Biophys. Acta, 176, 635, (1969)
- VELASCO, M. S. A., BENJAMIN, F. y GORDON, H. H., Amer. J. Obst. Gyn., 96, 930, (1966)

- VEREYKEN, J. M., MONTFOORT, A. y VAN GOLDE, L. M. G., *Biochim. Biophys. Acta*, 260, 70, (1972)
- VIKROT, O., *Acta Med. Scand.*, 53, 175, (1964)
- WATKINS, J. C., *Biochim. Biophys. Acta*, 152, 293, (1968)
- WEINHOLD, P. A., *J. Lipid Res.*, 9, 262, (1968)
- WEINHOLD, P. A. y VILLEE, C., *Biochim. Biophys. Acta*, 106, 540, (1966)
- WEST, C. E. y PASSEY, R. F., *Biochem. J.*, 102, 58, (1967)
- WILLES, R. F. y BODA, J. M., *Fed. Proc.*, 27, 496, (1968)
- WILLIAMSON, J. R., GARCIA, A., RENOLD, A. E. y CAHILL, G. F. Jr., *Diabetes*, 15, 183, (1966)
- WINAND, J., FORNELLE, J. y CHRISTPHE, J., *Biochim. Biophys. Acta*, 152, 280, (1968)
- WOLFE, B. M. J., ANHALT, B., BECK, J. C. y RUBINSTEIN, D., *Can. J. Biochem.*, 48, 170, (1970)
- WRIGHT, J. D. y GREEN, C., *Biochem. J.*, 123, 837, (1971)
- YAMASITA, S., HOSAKA, K. y NUMA, S., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 69, 3490, (1972a)
- YAMASITA, S. y NUMA, S., *Eur. J. Biochem.*, 31, 565, (1972b)
- YAMASITA, S. HOSAKA, K. y NUMA, S., *Eur. J. Biochem.*, 38, 25, (1973)
- YOUNG, D. L. y LYNEN, F., *J. Biol. Chem.*, 244, 377, (1969)
- YOUNG, D. L., *J. Lipid Res.*, 12, 590, (1971b)
- YOUNG, D. L., POWELL, G. y McMILLAN, W. O., *J. Lipid Res.*, 12, 1, (1971a)
- YOUNG, D. L. y TIERNEY, D. F., *Am. J. Physiol.*, 222, 1539, (1972)

ZACHMAN, R. D., KINSINGER, E. C. y GRAVEN, S. N., Abs. Soc. Ped.
Res., 39th Annual Meeting, p 40, (1969)

ZACHMAN, R. D., Biol. Neonate, 19, 211, (1971)

ZACHMAN, R. D., Biol. Neonate, 20, 448, (1972)

ZILVERSMIT, D. B., J. Lipid Res., 12, 36, (1971)

ZILVERSMIT, D. B., y HENDEL, E. V., Arch. Biochem. Biophys.
73, 224, (1958)